UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

Rogério Ferreira Lourenço

**Caracterização dos sistemas ChrR- σ^R e CC3476- σ^T na
resposta de *C. crescentus* aos estresses oxidativo e
osmótico**

São Paulo
04/08/2008

Rogério Ferreira Lourenço

**Caracterização dos sistemas ChrR- σ^R e CC3476- σ^T na
resposta de *C. crescentus* aos estresses oxidativo e
osmótico**

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção de Título de
Doutor em Ciências Biológicas (Bioquímica)

Orientadora: Profª. Dra. Suely Lopes Gomes

São Paulo
2008

Rogério Ferreira Lourenço

Caracterização dos sistemas ChrR- σ^R e CC3476- σ^T na resposta de *C. crescentus* aos estresses oxidativo e osmótico

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção de Título
de Doutor em Ciências Biológicas (Bioquímica)

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Aos meus queridos pais Geraldo e Nadir pelo amor e pelo apoio incondicional. Às minhas irmãs Silvana e Célia pela compreensão e amizade. À Amanda pelo amor, incentivo e companheirismo. Devo tudo o que sou a vocês.

Agradecimentos

À Profa Dra Suely Lopes Gomes pela oportunidade, confiança e orientação sempre presentes desde o início do desenvolvimento do presente trabalho. Cabe ressaltar também a imensa prontidão em ajudar.

À Dra Cristina Elisa Alvarez Martinez e à Dra. Michelle Fernanda Susin pela imensa ajuda durante a execução dos experimentos e nas análises e discussões de dados.

Aos Profs. Dra Marilis do Vale Marques, Dra Regina Lúcia Baldini, Dr. Frederico Gueiros Filho e Dr. Paolo Di Mascio pelas sugestões e críticas levantadas.

Aos Profs. Dra. Luci Shapiro, Urs Jenal e Dr. Michael T. Laub pelas cepas mutantes cedidas. Ao último também pelas lâminas de microarranjo.

À Profa. Dra. Rita de Cássia Simões pelas construções. Muitas das idéias foram oriundas de análises usando essas construções.

Aos colegas Maxuel, André Schuch e Yuri pela ajuda durante alguns experimentos.

À Luci pela grande ajuda na purificação de proteínas, pela prontidão em providenciar a compra de materiais e por me liberar do trauma adquirido durante a graduação de sequenciar amostras de DNA.

À Sandra e à Marivon pelo imenso apoio técnico. Se não fossem pelos meios de cultura e pelas placas lavadas, certamente não teria oportunidade de realizar uma parte considerável dos experimentos.

Aos amigos do laboratório André, César e Gianluca pelo companheirismo, pela oportunidade de compartilhar o entusiasmo de alguns resultados e a decepção de outros e, sobretudo, pela compreensão mútua.

Aos colegas de laboratório de ontem (Tie, Raphaela, Sílvia, Humberto Tambor, Humberto) e de hoje (Karina, Ana Laura, Ana Paula, Patrícia, Eliezer e Diogo) pela ajuda no dia a dia, pelos momentos de descontração e por fazerem do laboratório um ambiente agradável. Obrigado também por aceitarem minhas opiniões.

Ao pessoal do laboratório da Profa. Marilis (Vânia, Valéria e José) pela valiosa troca de informações conceituais ou técnicas.

Aos colegas de departamento pelas conversas descontraídas de corredor.

Aos grandes amigos Cléber e Sônia pela grandiosa ajuda em minha adaptação em São Paulo.

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Resumo

Lourenço, R.F. Caracterização dos sistemas ChrR- σ^R e CC3476- σ^T na resposta de *C. crescentus* aos estresses oxidativo e osmótico. 2008. 112 pg. Tese (Doutorado)- Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Caulobacter crescentus está entre as bactérias cujos genomas codificam um grande número de fatores sigma ECF, os quais estão envolvidos na regulação transcricional de conjuntos limitados de genes em resposta a uma variedade de estímulos ambientais. No presente trabalho, dois fatores sigma ECF de *C. crescentus*, σ^R e σ^T , foram caracterizados funcionalmente. Os dados mostraram que σ^R e σ^T são mantidos em níveis reduzidos de expressão sob condições fisiológicas de crescimento da bactéria, devido à ação das proteínas ChrR e CC3476, respectivamente. Contudo, durante a exposição de *C. crescentus* ao cádmio, hidroperóxido orgânico, oxigênio singlete ou à radiação UVA, a expressão de σ^R é induzida de maneira dependente do próprio fator sigma. Análises de transcriptoma mostraram que σ^R regula a expressão de genes envolvidos na proteção celular contra danos oxidativos. Central para essa resposta transcricional mediada por σ^R é a inativação de ChrR, sendo os resíduos C186 e C188 desta proteína necessários para a percepção de cádmio, mas não de hidroperóxido orgânico ou oxigênio singlete. Em adição, os dados mostraram que *sigR* e dois outros genes dependentes de σ^R (*cfaS* e CC2258) são essenciais para a sobrevivência de *C. crescentus* quando os danos oxidativos são gerados nas células por longos períodos. Similarmente, a expressão de σ^T aumenta em nível transcricional nesta bactéria sob condições de hiperosmolaridade induzidas por NaCl ou sacarose. Além de se auto-regular positivamente, σ^T controla a expressão de σ^U e σ^E , constituindo uma cascata de expressão de fatores sigma ECF em *C. crescentus*. σ^T , mas não σ^U e σ^E , desempenha um papel essencial na sobrevivência dessa bactéria durante a exposição ao NaCl e sacarose. Adicionalmente, a ausência de σ^T resulta numa sensibilidade aumentada dessa bactéria ao H₂O₂, apesar de não ser observada indução da expressão dos genes *sigT*, *sigU* e *sigE* durante essa condição de estresse. Diante

do exposto, o presente trabalho contribuiu para a compreensão de dois mecanismos de adaptação da bactéria *C. crescentus* aos estresses oxidativo ou osmótico.

Palavras-chave: estresse oxidativo, estresse osmótico, fator sigma ECF

Abstract

Lourenço, R.F. Characterization of the systems ChrR- σ^R and CC3476- σ^T in the responses to oxidative and osmotic stresses in *C. crescentus*. 2008. 112 pg. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Caulobacter crescentus is among the bacteria whose genomes encode a high number of ECF sigma factors, which are involved in the transcriptional regulation of a limited set of genes in response to several environmental signals. In the present work, two ECF sigma factors from *C. crescentus*, σ^R e σ^T , were functionally characterized. Data showed that σ^R e σ^T are maintained in reduced expression levels under physiological growth conditions, due to the action of ChrR and CC3476, respectively. However, during *C. crescentus* exposure to cadmium, organic hydroperoxide, singlet oxygen and UVA irradiation, σ^R expression is positively auto-regulated. Transcriptome analyses showed that σ^R regulates the expression of genes involved in protecting cells against oxidative damages. Central to this transcriptional response is the inactivation of ChrR, with residues C186 and C188 of this protein being necessary for sensing cadmium but not organic hydroperoxide or singlet oxygen. In addition, data revealed that *sigR* and two other σ^R -dependent genes (*cfaS* and CC2258) are essential for *C. crescentus* survival when oxidative damages are generated in the cells for long periods of time. Similarly, σ^T expression increases at a transcriptional level in this bacterium under hyperosmotic conditions induced by NaCl or sucrose. Besides being positively auto-regulated, σ^T independently controls the expression of σ^U and σ^E , forming an expression cascade of ECF sigma factors in *C. crescentus*. σ^T , but not σ^U or σ^E , displays an essential role in *C. crescentus* survival during NaCl or sucrose exposure. Additionally, the absence of σ^T leads to an increased sensitivity of this bacterium to H₂O₂, despite the absence of induction in *sigT*, *sigU* or *sigE* expression under the same stress condition. Therefore, the present work has contributed to the understanding of two mechanisms of *C. crescentus* adaptation to oxidative and osmotic stresses.

Keywords: oxidative stress, osmotic stress, ECF sigma factor

Lista de abreviaturas e siglas

AM- azul de metileno

DO- densidade ótica

ECF- “extracytoplasmic function”

EDTA- ácido etilenodiaminotetracético

Eros- espécies reativas de oxigênio

M2- meio mínimo definido

ORFs- “open reading frames”

PAGE- “polyacrylamide gel electrophoresis”

PCR- “polimerase chain reaction”

PYE- “peptone yeast extract”- meio complexo

RACE- “random amplification cDNA end”

RIP- “regulated intramembrane proteolysis”

ROOH- hidroperóxido orgânico

SDS- dodecilsulfato de sódio

tBOOH- *tert*-butil hidroperóxido

TIGR- “The Institute for Genomic Research”

UFC- unidade formadora de colônia

UV- ultravioleta

UVA- ultravioleta A (320- 400 nm)

UVB- ultravioleta B (290- 320 nm)

Sumário

1. Introdução	1
1.1. <i>Caulobacter crescentus</i> e seu ciclo de vida	1
1.2. Mecanismo de controle da transcrição por fatores sigma	2
1.3. Estresse oxidativo	8
1.4. Estresse osmótico	11
1.5. Respostas aos estresses oxidativo e osmótico em <i>C. crescentus</i>	12
2. Objetivos	15
3. Materiais e Métodos	16
3.1. Linhagens, plasmídeos e oligonucleotídeos	16
3.2. Meios e condições de crescimento	21
3.3. Reações de amplificação de DNA por PCR	21
3.4. Isolamento de plasmídeos e fragmentos de DNA, digestão com enzimas de restrição, ligação e sequenciamento	22
3.5. Transformação e conjugação	22
3.6. Estratégia usada para a obtenção de linhagens mutantes em <i>C. crescentus</i>	23
3.7. Ensaio de atividade da enzima β -galactosidase	27
3.8. Expressão de σ^R recombinante em <i>E. coli</i>	29
3.9. Purificação de His ₆ - σ^R e obtenção do anticorpo anti- σ^R	29
3.10. Western blot	30
3.11. Testes de viabilidade e curvas de crescimento	31
3.12. Obtenção de RNA total	33
3.13. Microarranjos de oligonucleotídeos	33
3.14. RT-PCR quantitativo	34
3.15. RACE 5'	35
4. Resultados	36
4.1. Caracterização do papel do gene <i>sigR</i> na resposta a estresses ambientais	36
4.1.1 Organização genômica de <i>sigR</i>	36
4.1.2. O gene <i>sigR</i> regula positivamente sua própria expressão	38
4.1.3. <i>chrR</i> regula negativamente a expressão de <i>sigR</i>	40
4.1.4. Mutantes nulos em <i>chrR</i> carregam mutações secundárias em <i>sigR</i>	43
4.1.5. A expressão de <i>sigR</i> é induzida por cádmio, hidroperóxido orgânico e oxigênio singlete	46
4.1.6. Os níveis da proteína σ^R aumentam em células expostas ao cádmio, tBOOH, ¹ O ₂ e à radiação UVA	50
4.1.7. Zinco suprime o efeito de cádmio sobre a expressão de <i>sigR</i>	53
4.1.8. Os resíduos C186 e C188 de ChrR são necessários para a percepção de cádmio, mas não de ¹ O ₂ e tBOOH	54
4.1.9. Efeito <i>in vivo</i> de proteases sobre a estabilidade de σ^R	57
4.1.10. Identificação de genes regulados por σ^R	58
4.1.11. Identificação da provável sequência promotora reconhecida por σ^R	66
4.1.12. Os genes <i>sigR</i> , <i>cfaS</i> e CC2258 são essenciais para a sobrevivência de <i>C. crescentus</i> ao estresse induzido por ¹ O ₂	69
4.1.13. <i>sigR</i> não está envolvido na resposta de <i>C. crescentus</i> a outras condições de estresses analisadas	72
4.2. Caracterização do papel de <i>sigT</i> , <i>sigU</i> e <i>sigE</i> na resposta aos estresses osmótico e oxidativo	72
4.2.1. Organização genômica dos genes <i>sigT</i> , <i>sigU</i> e <i>sigE</i>	72

4.2.2. O fator σ^T regula a expressão dos genes <i>sigU</i> e <i>sigE</i>	77
4.2.3. Os genes <i>sigT</i> , <i>sigU</i> e <i>sigE</i> são induzidos durante o choque hiperosmótico	80
4.2.4. O gene CC3476 regula negativamente a expressão dos genes <i>sigT</i> e <i>sigU</i>	82
4.2.5. O gene <i>sigT</i> confere resistência a <i>C. crescentus</i> durante os estresses osmótico e oxidativo	83
5. Discussão	85
5.1. Resposta transcricional ao estresse oxidativo mediada por σ^R em <i>C. crescentus</i>	85
5.2. Papel de ChrR na percepção de condições de estresse em <i>C. crescentus</i>	91
5.3. Efeito tóxico de σ^R quando presente em altos níveis em células de <i>C. crescentus</i>	95
5.4. Resposta mediada por σ^T ao estresse osmótico em <i>C. crescentus</i>	97
6. Conclusões	102
7. Referências.....	104
Apêndice.	109

1. Introdução

1.1. *Caulobacter crescentus* e seu ciclo de vida

Caulobacter crescentus é uma bactéria Gram-negativa pertencente à subdivisão α das proteobactérias, encontrada em ambientes aquáticos onde normalmente o pH está próximo da neutralidade e a disponibilidade de nutrientes é baixa. Nesses ambientes, *C. crescentus* encontra-se frequentemente associada com cianobactérias, estando portando exposta a altas concentrações de oxigênio (Poindexter, 1981).

Uma das características marcantes desse organismo refere-se ao seu ciclo de vida peculiar, onde uma célula assimétrica dá origem por divisão a duas células filhas distintas em relação à morfologia, programa de desenvolvimento e capacidade de replicação do DNA (Ryan and Shapiro, 2003). Uma das células filhas formadas, a célula talo, é capaz de iniciar a replicação do DNA e entrar imediatamente no ciclo celular. Essa célula é assim denominada devido à presença de uma extensão da membrana plasmática e da parede celular, o talo, que possui material adesivo em sua extremidade e é responsável pela fixação da bactéria a uma superfície sólida (Pate and Ordal, 1965). Durante o crescimento, uma cascata de eventos finamente regulados leva à biogênese de um flagelo no pólo oposto ao talo, resultando em uma nova célula pré-divisional assimétrica (Brun *et al.*, 1994; Gober and Marques, 1995) (Fig. 1).

Em contraste, a outra célula filha gerada a partir da célula assimétrica inicial é móvel, característica essa conferida pela presença de um flagelo polar, tem capacidade quimiotática e possui fímbrias, sendo estas estruturas responsáveis pela sensibilidade de *C. crescentus* à infecção por fagos de DNA. Além disso, essa célula é incapaz de replicar seu DNA enquanto não se diferenciar numa célula talo. Essa diferenciação ocorre sob controle de sinais internos, sendo marcada pela perda do flagelo e das fímbrias e pela formação de um talo no mesmo pólo da célula previamente ocupado pelo flagelo,

através da síntese da parede e membrana celular. Simultaneamente à biogênese do talo, ocorre a iniciação da replicação do DNA. A célula assim formada é agora capaz de progredir no ciclo celular da mesma forma que a célula talo originada a partir da célula assimétrica inicial (Ryan and Shapiro, 2003) (Fig. 1).

Figura 1. Diagrama esquemático do ciclo de vida de *Caulobacter crescentus*. Estão mostrados os principais eventos celulares que ocorrem em cada fase do ciclo de vida e as diferentes formas morfológicas da bactéria.

Devido ao seu ciclo de vida peculiar, onde diferentes estágios do ciclo celular estão associados a morfologias distintas, *Caulobacter crescentus* tornou-se um dos principais modelos de estudo para diferenciação celular entre as bactérias Gram-negativas (Brun *et al.*, 1994; Ryan and Shapiro, 2003).

1.2. Mecanismo de controle da transcrição por fatores sigma

A transcrição gênica em bactérias depende da presença da holoenzima RNA polimerase, formada pela associação de um núcleo catalítico com uma subunidade sigma (ou fator sigma). Essa subunidade é responsável diretamente pelo reconhecimento de seqüências promotoras específicas, atuando também na abertura da dupla-hélice de DNA próximo ao sítio de início da transcrição (Helmann and Chamberlin, 1988).

Um fator sigma, denominado sigma principal, está sempre presente numa célula bacteriana e é responsável pela transcrição de genes relacionados com o crescimento, diferenciação e divisão celular, sendo, portanto, essencial para a bactéria. Além do fator sigma principal, um número variável de outros fatores sigma, comumente referidos como fatores sigma alternativos, pode ser codificado pelo genoma das bactérias. Esses fatores sigma alternativos são, em sua maioria, não-essenciais e atuam no controle da expressão de um conjunto limitado de genes em resposta a uma variedade de estímulos ambientais ou internos (Helmann and Chamberlin, 1988). Como diferentes fatores sigma reconhecem diferentes conjuntos de promotores, o perfil de expressão gênica pode ser modificado através da alteração do fator sigma disponível para transcrição. Dessa forma, a presença de múltiplos fatores sigma diferentes em uma célula permite a existência de um mecanismo de regulação de expressão gênica que ocorre em nível de transcrição (Gruber and Gross, 2003).

Com base na estrutura, função e mecanismo de iniciação da transcrição, os fatores sigma podem ser divididos em duas famílias: σ^{54} e σ^{70} (Wosten, 1998). As proteínas pertencentes à família σ^{54} são fatores sigma alternativos e geralmente são responsáveis pela transcrição de genes relacionados com o metabolismo de nitrogênio nas bactérias. Por outro lado, membros da família σ^{70} podem ser tanto fatores sigma principais como alternativos, e estão envolvidos numa ampla diversidade de funções celulares. Enquanto a holoenzima contendo um fator sigma da família σ^{70} é suficiente para iniciar a transcrição gênica, proteínas ativadoras e ATP são requeridos para a formação do complexo aberto pela RNA polimerase associada com fatores sigma da família σ^{54} (Buck *et al.*, 2000). A família σ^{70} , que compreende a maioria dos fatores sigma, pode ainda ser subdividida em vários subgrupos com base em uma análise filogenética (Lonetto *et al.*, 1992). Dentre esses grupos, a subfamília ECF (“extracytoplasmic function”) é formada pelos membros mais divergentes entre si, muitos dos quais

foram originalmente relacionados com a regulação da expressão gênica em resposta a mudanças no compartimento extracitoplasmático das bactérias (Helmann, 2002; Lonetto *et al.*, 1994).

Embora pertençam à família σ^{70} , os fatores sigma ECF possuem algumas particularidades do ponto de vista estrutural que os diferencia dos demais membros dessa família de proteínas: i) ausência da região 1, a qual é responsável por parte da atividade de helicase de DNA exercida pela holoenzima RNA polimerase. ii) ausência do domínio 3, o qual está envolvido na interação do fator sigma com o DNA e com o cerne da RNA polimerase. Todavia, funções semelhantes às aquelas desempenhadas pela região 1 e pelo domínio 3 também são exercidas pelo domínio 2. Dessa forma, enquanto membros da subfamília ECF dobram-se em apenas dois domínios globulares, os demais fatores sigma pertencentes à família σ^{70} são constituídos por três domínios (domínios 2, 3 e 4) além de um segmento N-terminal flexível, a região 1 (Wosten, 1998; Lonetto *et al.*, 1994). Nos fatores sigma principais, essa região N-terminal é maior e também atua na auto-inibição, impedindo a ligação destes fatores sigma às suas seqüências-alvos na ausência do cerne catalítico da RNA polimerase. Por outro lado, os fatores sigma alternativos são capazes de se ligar às regiões promotoras dos genes por eles regulados mesmo na ausência dessa enzima. Uma vez que o cerne da RNA polimerase possui uma afinidade alta pelo DNA da bactéria, a ausência da região auto-inibitória em um fator sigma alternativo facilita a associação entre o cerne dessa enzima e o fator sigma alternativo. Isso é particularmente importante já que os fatores sigma principais estão presentes em maior concentração na bactéria, o que poderia dificultar a transcrição dos genes dependentes dos fatores sigma alternativos (Vuthoori *et al.*, 2001).

Apesar de os fatores sigma ECF controlarem a expressão de conjuntos distintos de genes, certa similaridade é observada em relação às seqüências promotoras reconhecidas por diferentes fatores sigma (Missiakas and Raina, 1998). Dentre as duas regiões das seqüências promotoras reconhecidas por um fator sigma, a região -35 mostra um grau de conservação superior ao exibido pela região -10,

ao comparar seqüências promotoras consenso reconhecidas por diferentes fatores sigma ECF, sendo que o trinucleotídeo AAC está quase invariavelmente presente na região -35 dessas seqüências. A mesma conservação relativa é evidente quando se analisam as diferentes regiões protéicas dos membros da subfamília ECF, envolvidas no reconhecimento das seqüências promotoras. Assim, as regiões de ligação à seqüência -35 (denominadas 4.2 e pertencentes ao domínio 4), são bastante conservadas nos vários fatores sigma ECF, enquanto as regiões de ligação à seqüência -10 (conhecidas como 2.4 e pertencentes ao domínio 2), exibem um menor grau de similaridade. Isso indica uma correlação entre os graus de conservação das seqüências dentro do promotor e das regiões de ligação correspondentes no fator ECF. Além disso, a diversidade das seqüências -10 dos promotores e das regiões 2.4 dos fatores sigma ECF pode explicar a co-existência de vários membros da subfamília ECF numa mesma célula sem que haja sobreposição das funções biológicas exercidas por tais proteínas. Isto se deve ao fato de que cada um destes fatores sigma é capaz de reconhecer uma determinada região -10 e transcrever apenas os genes controlados por promotores contendo essa região (Helmann, 2002).

Embora exista uma grande diversidade entre os fatores sigma ECF com relação à seqüência primária e à função celular exercida, algumas características comuns podem ser notadas na maioria dos casos (Helmann, 2002): i) Fatores sigma ECF têm suas atividades reguladas negativamente através da interação com proteínas específicas conhecidas como fatores anti-sigma. ii) O gene codificando um fator sigma ECF localiza-se a montante do gene que codifica o fator anti-sigma cognato, em uma mesma unidade de transcrição. iii) O códon de parada do gene que codifica o fator sigma ECF encontra-se sobreposto ao códon de início do gene que codifica o fator anti-sigma correspondente, permitindo que um mesmo ribossomo traduza ambas as regiões codificadoras sem se dissociar do mRNA. iv) O fator sigma ECF é capaz de regular positivamente sua própria expressão assim como do

gene codificando o fator anti-sigma, presente na mesma unidade de transcrição. Desse modo, nos casos onde essas características são evidentes, sigma e anti-sigma são sintetizados de forma estequiométrica, o que garante a inativação do fator sigma ECF durante as condições normais de crescimento da bactéria. Todavia, um aumento na concentração de um indutor específico, como proteínas desenoveladas ou espécies reativas de oxigênio, resultantes da condição de estresse ambiental, leva à inativação do fator anti-sigma e, conseqüentemente, à liberação do fator sigma ECF. Uma vez ativo, esse fator sigma pode direcionar a RNA polimerase para transcrever um conjunto específico de genes que permitem ao organismo responder à condição adversa de crescimento (Missiakas and Raina, 1998).

A análise dos mecanismos de inativação de fatores anti-sigma caracterizados até o momento permite estabelecer uma correlação perfeita entre a localização subcelular do fator anti-sigma e o modo pelo qual sua inativação ocorre. Assim, fatores anti-sigma que são proteínas integrais de membrana são inativados irreversivelmente através da ação sucessiva e hierárquica de proteases localizadas na membrana plasmática ou no citoplasma da bactéria (Ades, 2004; Schobel *et al.*, 2004; Zellmeier *et al.*, 2006). As proteases intra-membranares, denominadas DegS e YaeL em *E. coli*, envolvidas nesta função pertencem a uma via de transdução de sinal denominada RIP (“regulated intra-membrane proteolysis”) que é amplamente encontrada entre os organismos procarióticos e eucarióticos (Ehrmann and Clausen, 2004). Uma vez que um fator sigma é ativado somente durante condições específicas de estresse, foi proposto que tais condições são necessárias para a ativação da primeira protease envolvida na degradação do fator anti-sigma correspondente. Adicionalmente, a hierarquia observada na ação das proteases intra-membranares implica que a clivagem do fator anti-sigma pela primeira protease consiste no sinal para a ativação da segunda protease (Ades, 2004). A ação dessas proteases resulta na liberação do fator sigma ainda associado com a porção restante do fator anti-

sigma no citoplasma da bactéria. Finalmente, essa porção é reconhecida e degradada pela protease citoplasmática ClpXP, resultando na liberação do fator sigma sob a forma ativa (Ades, 2004; Zellmeier *et al.*, 2006). Contudo, a inativação do fator sigma, que deve ocorrer quando o estresse for interrompido, necessita da síntese de novas moléculas do fator anti-sigma.

Por outro lado, a inativação de fatores anti-sigma solúveis no citoplasma ocorre como consequência de alterações conformacionais reversíveis dos mesmos. Como a posição de muitos dos resíduos de aminoácidos do fator anti-sigma responsáveis pela interação com o fator sigma correspondente é alterada com essa mudança conformacional, as duas proteínas se dissociam na bactéria. Todavia, uma vez restabelecidas as condições do citoplasma, o fator anti-sigma retorna a sua conformação nativa, associando-se novamente com o fator sigma cognato. Como esperado com base em sua localização subcelular, os fatores anti-sigma solúveis estão envolvidos na percepção de sinais citoplasmáticos. Proteínas já caracterizadas que pertencem a essa classe de fatores anti-sigma estão envolvidas na percepção do estado redox da bactéria e têm suas estruturas moduladas pelo equilíbrio $\text{tiol} \leftrightarrow \text{dissulfeto}$ de resíduos específicos de cisteína (Bae *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2003).

Apesar de os fatores anti-sigma serem bastante diferentes em nível de sequência primária, as regiões destas proteínas responsáveis pela interação com os fatores sigma correspondentes exibem uma semelhança marcante entre si do ponto de vista estrutural. Por outro lado, os restantes das seqüências dos fatores anti-sigma não se dobram em estruturas similares, o que poderia explicar a diversidade de sinais e mecanismos regulatórios controlando a atividade dessas proteínas (Campbell *et al.*, 2007). Em suma, a combinação de um domínio N-terminal envolvido na associação ao fator sigma com uma variedade de domínios C-terminal permite às bactérias responderem às varias condições de estresse encontradas em seus ambientes naturais.

1.3. Estresse oxidativo

A radiação solar é uma das condições de estresse mais comumente encontrada pelas bactérias em seus ambientes naturais. Radiações com comprimento de onda variando de 320 a 700 nm (ultravioleta A e visível) são conhecidas por mediar seus efeitos biológicos através da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Wondrak *et al.*, 2006). Após absorverem tais radiações, compostos endógenos da célula, conhecidos como sensibilizadores, são excitados a estados tripletes altamente reativos, podendo decair novamente ao estado fundamental através da emissão de energia ou passar por reações fotoquímicas. No último caso, a energia dos sensibilizadores pode ser transferida diretamente para o oxigênio molecular em seu estado fundamental, gerando oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (mecanismo tipo I). Alternativamente, a reação envolvendo um sensibilizador excitado pode prosseguir através da transferência de um elétron para o oxigênio molecular, gerando ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e um radical derivado do sensibilizador (mecanismo tipo II). A transferência espontânea ou mediada por uma enzima de outro elétron para o $\text{O}_2^{\bullet-}$ gera peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual pode reagir com metais de transição como ferro e cobre, dando origem ao radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$) (Wondrak *et al.*, 2006).

A exposição bacteriana a metais pesados consiste numa outra condição ambiental conhecida por induzir um aumento na concentração intracelular de EROs (Stohs and Bagchi, 1995). Alguns metais pesados, incluindo ferro, cobre e cromo, podem gerar EROs diretamente na célula devido à capacidade desses metais em sofrer reações de óxido-redução. Em contraste, outros metais pesados como cádmio, chumbo e mercúrio são capazes de se ligar a grupos tióis (-SH) e oxidá-los após a dissociação desses metais. Como consequência, ocorre uma depleção da glutatona sob a forma reduzida. Uma vez que a glutatona consiste numa importante defesa antioxidante da célula, a exposição bacteriana a essa última classe de metais pesados resulta no aumento da concentração

intracelular de EROs. Contudo, alguns metais pesados, principalmente cádmio e mercúrio, também podem mediar seus efeitos citotóxicos de maneira independente da ação de EROs. Exemplos bem conhecidos consistem na dissociação de íons como zinco ou ferro ligados a metaloproteínas e na oxidação direta de grupos tióis presentes em proteínas (Stohs and Bagchi, 1995).

As EROs geradas sob tais condições ambientais podem levar a célula à morte devido aos danos oxidativos que causam em importantes componentes celulares. Desestruturação de centros Fe-S e oxidação de cadeias laterais de aminoácidos (em especial, cisteína e metionina) e do esqueleto peptídico podem levar à inativação, desnaturação, agregação e fragmentação das proteínas, além da formação de ligações cruzadas entre proteínas. Danos em ácidos nucleicos incluem oxidação de pirimidinas e purinas (principalmente guanina) e riboses, resultando em quebras de simples ou dupla fita e no aumento da taxa das transversões G→C e G→T e da transição C→T em DNA. A formação de nucleotídeos modificados aparece como responsável pela última consequência devido à capacidade dos mesmos em parear com nucleotídeos não-correspondentes. Uma terceira classe de biomoléculas danificadas pela ação de EROs é constituída por ácidos graxos. Como as EROs reagem principalmente com regiões de alta densidade eletrônica, os ácidos graxos poliinsaturados consistem em alvos preferenciais durante a oxidação dos lipídeos celulares. Além de levar à perda da integridade da membrana plasmática, os produtos da oxidação de ácidos graxos, incluindo aldeídos e hidrocarbonetos, são capazes de danificar proteínas e ácidos nucleicos associados ou não à membrana (Halliwell, 1999).

Dentre as EROs, $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 apresentam reatividade apenas moderada, agindo diretamente sobre centros Fe-S e grupos tióis, respectivamente. Contudo, a interação de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 com ferro também é responsável por muitos outros efeitos citotóxicos causados durante a exposição celular a essas EROs, já que resulta na geração de $OH^{\bullet}$, a mais reativa dentre as EROs. $OH^{\bullet}$ pode agir indiscriminadamente

sobre os alvos biológicos, sendo responsável, juntamente com $^1\text{O}_2$, pela formação de hidroperóxidos orgânicos (ROOH) na célula. Radicais peroxil e alcoxil gerados a partir da decomposição dos ROOH na presença de metais como ferro e cobre podem propagar os danos oxidativos através da geração de novos ROOH e $^1\text{O}_2$ (Halliwell, 1999).

Para se proteger contra os danos oxidativos, a célula dispõe de mecanismos envolvidos na desativação de EROs, na detoxificação de metais pesados, no reparo de moléculas danificadas e na eliminação de intermediários tóxicos da oxidação. Enquanto a desativação de $\text{O}_2^{\cdot-}$ é realizada especificamente pela enzima superóxido dismutase, uma série de peroxidases, empregando mecanismos distintos, é responsável pela eliminação de H_2O_2 e ROOH na célula. Exceto pela catalase, as demais peroxidases requerem uma constante reciclagem de formas reduzidas de glutathione, tioredoxina e NADP^+ para a detoxificação dos peróxidos. Além desses sistemas, vários antioxidantes não enzimáticos como glutathione, ácido ascórbico, α -tocoferol e carotenóides estão envolvidos na direta desativação de EROs. Dos mecanismos responsáveis pela diminuição da toxicidade exercida pelos metais pesados fazem parte proteínas que se ligam a esses metais, incluindo ferritinas e metalotioneínas, sequestrando-os sob uma forma inativa, ou que são responsáveis pelo efluxo dos metais pesados, mantendo-os em baixas concentrações intracelulares. Proteases, chaperones e proteínas envolvidas na redução de formas oxidadas de cisteína e metionina são necessárias para o reparo de proteínas. Sistemas de reparo de DNA (por excisão e recombinação) e proteínas responsáveis pela degradação de nucleotídeos livres oxidados contribuem para diminuir o efeito mutagênico das EROs. Ácidos graxos oxidados presentes em lipídeos de membrana podem ser reparados ou degradados após serem excisados pela ação de fosfatases. Adicionalmente, produtos da oxidação de biomoléculas podem ser complexados com glutathione, reduzidos ou oxidados, diminuindo a toxicidade (Halliwell, 1999).

1.4. Estresse osmótico

Em seus ambientes naturais, as bactérias são frequentemente expostas a condições de hiperosmolaridade. Uma vez que a membrana citoplasmática é permeável à água, mas forma uma barreira efetiva contra a passagem de solutos presentes no meio, o aumento da osmolaridade extracelular resulta no efluxo de água e na perda de turgor celular. Como consequência, a bactéria pode sofrer plasmólise, uma situação na qual a membrana citoplasmática perde contato com a parede celular (Poolman and Glaasker, 1998).

Um dos mais rápidos e eficientes mecanismos responsáveis pela sobrevivência da bactéria em condições de hiperosmolaridade consiste no acúmulo intracelular de solutos específicos, o que garante o restabelecimento da osmolaridade da célula. Tais solutos são frequentemente referidos como solutos compatíveis porque podem ser acumulados em altos níveis sem interferir com algum processo celular. Em bactérias Gram-negativas, o acúmulo inicial de solutos ocorre através da captação de íons K^+ a partir do meio externo, juntamente com o aumento da síntese de glutamato ou do efluxo de prótons, mantendo o citoplasma num estado eletronicamente neutro. Contudo, ao longo do estresse osmótico, tais solutos iônicos são substituídos por solutos não-carregados ou zwitteriônicos como glicina betaína, prolina e trealose, os quais são sintetizados intracelularmente ou captados a partir do meio externo (Csonka, 1989). Por outro lado, bactérias Gram-positivas respondem ao estresse osmótico acumulando apenas solutos eletronicamente neutros com glicina betaína, prolina e carnitina, já que altas concentrações de K^+ e glutamato estão presentes nas células mesmo durante condições normais de crescimento (Poolman and Glaasker, 1998).

Interessantemente, danos oxidativos em componentes celulares acumulam-se ao longo do choque hiperosmótico, e vários mecanismos antioxidantes desempenham papel crucial para a sobrevivência da bactéria sob tais condições (Lee *et al.*, 2005; Nystrom, 2004). Contudo, os danos oxidativos

aparecem como um efeito secundário do choque hiperosmótico, já que os solutos capazes de induzir essa condição de estresse, quando presentes extracelularmente, não podem oxidar diretamente as biomoléculas na célula. Uma provável explicação seria a ocorrência de alterações estruturais nos constituintes celulares durante o choque hiperosmótico, aumentando a suscetibilidade dos mesmos de serem oxidados pelas EROs geradas como consequência do metabolismo aeróbico basal da célula (Lee *et al.*, 2005).

1.5. Respostas aos estresses oxidativo e osmótico em *C. crescentus*

Ao comparar o número de genes codificando fatores sigma entre as diversas espécies de bactérias que têm seus genomas já seqüenciados, percebe-se que *C. crescentus* apresenta uma quantidade relativamente grande, totalizando 16 matrizes de leitura aberta (ORFs) (Nierman *et al.*, 2001). Dentre os potenciais fatores sigma dessa bactéria, o σ^{73} corresponde ao fator sigma principal, o σ^{54} é responsável pela biossíntese do flagelo polar e o σ^{32} media parte da resposta ao choque térmico. Os demais fatores sigma de *C. crescentus* são membros da subfamília ECF, sugerindo uma grande capacidade dessa espécie em responder a vários estímulos ambientais. Isso é particularmente importante já que as condições nas quais *C. crescentus* é normalmente encontrada exigem um alto grau de adaptação do organismo, incluindo mecanismos de resposta a alterações na salinidade do ambiente e no estado oxidativo do citoplasma (Poindexter and Hagenzieker, 1981). De fato, a caracterização funcional do primeiro fator sigma ECF de *C. crescentus*, denominado σ^F , revelou que parte da resposta celular ao H_2O_2 é mediada por este fator sigma, devido ao seu envolvimento no controle transcricional de um conjunto importante de genes relacionados à defesa antioxidante da bactéria. Interessantemente, σ^F contribui para a resistência celular ao H_2O_2 apenas durante a fase estacionária de crescimento da bactéria, quando os níveis desse fator sigma aumentam na célula como

consequência principalmente da queda dos níveis da protease FtsH envolvida em sua degradação (Alvarez-Martinez *et al.*, 2006). Adicionalmente, a expressão de genes não-regulados por σ^F , como *sodC* (codifica uma cobre-zinco superóxido dismutase de localização periplasmática), *katG* (o gene da catalase/peroxidase) e *skgA* (codifica o regulador transcricional de *katG*) também aumenta durante a fase estacionária (Rava *et al.*, 1999; Schnell and Steinman, 1995), explicando porque a bactéria *C. crescentus* torna-se cerca de seis vezes mais resistente ao H_2O_2 nessa fase de crescimento.

Análises transcricionais dos estresses induzidos por cádmio, cromo, selênio e urânio em *C. crescentus* permitiram a identificação de importantes componentes da resposta desta bactéria à toxicidade mediada por estes metais pesados, sendo evidente em todos os casos a indução de genes relacionados à proteção contra danos oxidativos. A manutenção de concentrações intracelulares reduzidas de metais pesados, através da indução de genes relacionados com o efluxo dos metais ou da diminuição da expressão de genes envolvidos na captação dos mesmos, também faz parte da resposta de *C. crescentus* ao cádmio e ao cromo (Hu *et al.*, 2005). Dentre esses genes envolvidos no efluxo de metais, quatro se mostraram necessários para a sobrevivência dessa bactéria à exposição ao cádmio. Embora não tenham sido induzidos durante essa condição de estresse, oito outros genes de *C. crescentus* foram implicados na defesa desta bactéria contra a toxicidade exercida pelo cádmio (Braz and Marques, 2005).

Em adição aos mecanismos relacionados diretamente com a proteção de *C. crescentus*, genes codificando reguladores de transcrição também tiveram a expressão aumentada durante a exposição desta bactéria ao cádmio, cromo e urânio, sugerindo que estes genes podem ser responsáveis por mediar as respostas transcricionais observadas como decorrentes dessas condições de estresse. Dentre esses genes reguladores, três codificam prováveis fatores sigma ECF possivelmente envolvidos na resposta ao cádmio (CC0648) ou ao cromo (CC2883 e CC3475) (Hu *et al.*, 2005).

Ao contrário do estresse oxidativo, apenas alguns genes são conhecidos por conferir resistência à bactéria *C. crescentus* durante condições de hiperosmolaridade induzidas por sacarose e/ou NaCl. Dentre esses genes, *nhaA* codifica um transportador do tipo antiporte envolvido no efluxo de Na⁺, *ppiD* atua no dobramento protéico, e três outros genes estão provavelmente envolvidos na biossíntese do envelope celular (Zuleta *et al.*, 2003). A função desempenhada pelas chaperones GroESL e FtsH também se mostrou essencial para a sobrevivência dessa bactéria durante tais condições de estresse (Fischer *et al.*, 2002; Susin *et al.*, 2006).

Contudo, pouco se sabe acerca dos mecanismos moleculares responsáveis por sentir o estado redox ou o potencial osmótico em *C. crescentus* e desencadear as respostas transcricionais que permitem a essa bactéria sobreviver durante condições de estresse oxidativo e osmótico. Assim, o conhecimento referente ao controle da expressão de proteínas reguladoras durante tais condições de estresse bem como a identificação dos genes-alvos dessas proteínas torna-se necessário para a caracterização desses mecanismos moleculares e para a elaboração de modelos de regulação da expressão gênica em *C. crescentus*.

2. Objetivos

- Caracterizar o papel dos genes *sigR*, *sigT*, *sigU* e *sigE* na resposta de *C. crescentus* a estresses ambientais.
- Investigar o papel de prováveis fatores anti-sigma no controle transcricional de *sigR*, *sigT*, *sigU* e *sigE*.

3. Materiais e Métodos

3.1. Linhagens, plasmídeos e oligonucleotídeos

As linhagens e os plasmídeos (Tabela 1), bem como os oligonucleotídeos utilizados no presente trabalho (Tabela 2) estão listados abaixo.

Tabela 1. Lista de linhagens e plasmídeos.

Linhagem	Genótipo	Referência
<i>E. coli</i>		
DH5 α	$\Delta(lacZYA-argF)$ U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17 phoA sup144 thi-1 gyrA96 relA1</i> ($\phi 80 lacZDM15$)	Invitrogen
S17-1	F ⁺ lambda(-) <i>thi pro recA hsdR⁻ hsdM⁺</i> , derivada de RP4	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
<i>C. crescentus</i>		
NA1000	<i>syn</i> -1000, cepa sincronizável derivada da linhagem selvagem CB15 de <i>C. crescentus</i>	(Evinger and Agabian, 1977)
SG100	NA1000 Δ CC2751 ($\Delta sigE$)	este trabalho
SG200	NA1000 Δ CC0648 ($\Delta sigR$)	este trabalho
SG210	NA1000 Δ CC1039 ($\Delta msrA$)	este trabalho
SG211	NA1000 Δ CC1427 ($\Delta cfaS$)	este trabalho
SG212	NA1000 Δ CC2258	este trabalho
SG213	NA1000 Δ CC1039 Δ CC2258	este trabalho
SG250	NA1000 Δ CC0647 ($\Delta chrR$)/ pRL390	este trabalho
SG251-1	NA1000 Δ CC0647 ($\Delta chrR$)/ substituição G181A em <i>sigR</i>	este trabalho
SG251-2a	NA1000 Δ CC0647 ($\Delta chrR$)/ inserção C384 em <i>sigR</i>	este trabalho
SG251-2b	NA1000 Δ CC0647 ($\Delta chrR$)/ inserção C384 em <i>sigR</i>	este trabalho
SG252	NA1000 Δ CC0647 ($\Delta chrR$)/ expressando ChrR/C186S	este trabalho
SG253	NA1000 Δ CC0647 ($\Delta chrR$)/ expressando ChrR/C188S	este trabalho
SG254	NA1000 Δ CC0647 ($\Delta chrR$)/ expressando ChrR/C186-188S	este trabalho
SG546	NA1000 <i>sigU::</i> Ω	(Alvarez-Martinez <i>et al.</i> , 2007)
ML163	NA1000 Δ CC3475 ($\Delta sigT$)	(Alvarez-Martinez <i>et al.</i> , 2007)
UJ945	NA1000 <i>ftsH::</i> Ω	(Fischer <i>et al.</i> , 2002)
LS2382	NA1000 <i>lon::</i> Ω	(Wright <i>et al.</i> , 1996)
LS3706	NA1000 Δ CC1916 ($\Delta mmpA$)	(Chen <i>et al.</i> , 2005)
LS4049	NA1000 Δ CC0151 Δ CC0702 Δ CC1282:: Ω aacC4 Δ CC2758:: Ω	(Chen <i>et al.</i> , 2005)
Plasmídeos	Descrição	Referência
pGEM-T	Vetor de clonagem de produtos de PCR, Amp ^R	Promega
pNPTS138	Plasmídeo suicida com <i>sacB</i> e <i>oriT</i> , Kan ^R	(Tsai and Alley, 2000)

pPROEXHTa	Vetor para expressão de proteínas contendo cauda His ₆ , Amp ^R	Invitrogen
pJS14	Vetor para expressão constitutiva de genes em <i>C. crescentus</i> a partir do promotor P _{lacZ} , Cm ^R e <i>oriT</i>	J. Skerker
pUJ142	Vetor derivado de pJS14 através da inserção do promotor P _{xyIX} , Cm ^R	U. Jenal
pRKLacZ290	Vetor para fusão de transcrição ao gene <i>lacZ</i> , Tet ^R	(Gober and Shapiro, 1992)
pRL100	Fragmento de 630 pb contendo <i>sigE</i> clonado em pGEM-T	este trabalho
pRL101	Fragmento de 782 pb contendo a região 5' de <i>sigE</i> clonado em pGEM-T	este trabalho
pRL102	Fragmento de 647 pb contendo a região 3' de <i>sigE</i> clonado em pGEM-T	este trabalho
pRL140	Fragmento EcoRI-PstI de 1432 pb contendo Δ <i>sigE</i> e regiões flanqueadoras clonado em pNPTS128. Esse fragmento foi gerado através da clonagem simultânea dos insertos de pRL101 e pRL102 em pNPTS128	este trabalho
pRL180	Fragmento EcoRI-PstI de 649 pb de pRL100 clonado em pJS14 para expressão constitutiva de <i>sigE</i> a partir do promotor P _{lacZ}	este trabalho
pRL200	Fragmento de 705 pb contendo <i>sigR</i> clonado em pGEM-T	este projeto
pRL201	Fragmento de 1053 pb contendo a região 5' de <i>sigR</i> clonado em pGEM-T	este projeto
pRL202	Fragmento de 726 pb contendo a região 3' de <i>sigR</i> clonado em pGEM-T	este projeto
pRL203	Fragmento de 1015 pb contendo a região 5' de <i>msrA</i> clonado em pGEM-T	este projeto
pRL204	Fragmento de 1016 pb contendo a região 3' de <i>msrA</i> clonado em pGEM-T	este projeto
pRL205	Fragmento de 1052 pb contendo a região 5' de <i>cfaS</i> clonado em pGEM-T	este projeto
pRL206	Fragmento de 994 pb contendo a região 3' de <i>cfaS</i> clonado em pGEM-T	este projeto
pRL207	Fragmento de 1048 pb contendo a região 5' de CC2258 clonado em pGEM-T	este projeto
pRL208	Fragmento de 1026 pb contendo a região 3' de CC2258 clonado em pGEM-T	este projeto
pRL240	Fragmento EcoRI-PstI de 1761 pb contendo Δ <i>sigR</i> e regiões flanqueadoras clonado em pNPTS128. Esse fragmento foi gerado através da clonagem simultânea dos insertos de pRL201 e pRL202 em pNPTS128	este projeto
pRL241	Fragmento EcoRI-SpeI de 20341 pb contendo Δ <i>msrA</i> e regiões flanqueadoras clonado em pNPTS128. Esse fragmento foi gerado através da clonagem simultânea dos insertos de pRL203 e pRL204 em pNPTS128	este projeto
pRL242	Fragmento PstI-SpeI de 2049 pb contendo Δ <i>cfaS</i> e regiões flanqueadoras clonado em pNPTS128. Esse fragmento foi gerado através da clonagem simultânea dos insertos de pRL205 e pRL206 em pNPTS128	este projeto
pRL243	Fragmento EcoRI-SpeI de 2077 pb contendo Δ CC2258 e regiões flanqueadoras clonado em pNPTS128. Esse fragmento foi gerado através da clonagem simultânea dos insertos de pRL207 e pRL208 em pNPTS128	este projeto

pRL270	Fragmento EcoRI-KpnI de 689 pb de pRL200 clonado em pPROEXHTa para gerar His ₆ -σ ^R em fusão de tradução	este projeto
pRL280	Fragmento EcoRI-PstI de 726 pb de pRL200 clonado em pJS14 para expressão constitutiva de <i>sigR</i> a partir do promotor P _{lacZ}	este projeto
pRL290	Fragmento SpeI-KpnI de 720 pb de pRL200 clonado em pUJ142 para gerar uma fusão de tradução entre <i>sigR</i> e os primeiros 151 códonos do gene <i>xytX</i>	este projeto
pRL300	Fragmento de 673 pb contendo <i>chrR</i> clonado em pGEM-T	este projeto
pRL301	Fragmento de 1226 pb contendo a região 5' de <i>chrR</i> clonado em pGEM-T	este projeto
pRL302	Fragmento de 1065 pb contendo a região 3' de <i>chrR</i> clonado em pGEM-T	este projeto
pRL303	Fragmento de 1950 pb contendo a substituição nucleotídica T556A em <i>chrR</i> clonado em pGEM-T	este projeto
pRL304	Fragmento de 1950 pb contendo a substituição nucleotídica T562A em <i>chrR</i> clonado em pGEM-T	este projeto
pRL305	Fragmento de 1950 pb contendo as substituições nucleotídicas T556A e T562A em <i>chrR</i> clonado em pGEM-T	este projeto
pRL340	Fragmento EcoRI-PstI de 2273 pb contendo Δ <i>chrR</i> e regiões flangeadoras clonado em pNPTS128. Esse fragmento foi gerado através da clonagem simultânea dos insertos de pRL301 e pRL302 em pNPTS128	este projeto
pRL341	Fragmento EcoRI-SpeI de pRL303 clonado em pNPTS128	este projeto
pRL342	Fragmento EcoRI-SpeI de pRL304 clonado em pNPTS128	este projeto
pRL343	Fragmento EcoRI-SpeI de pRL305 clonado em pNPTS128	este projeto
pRL380	Fragmento EcoRI-PstI de 694 pb de pRL300 clonado em pJS14 para expressão constitutiva de <i>chrR</i> a partir do promotor P _{lacZ}	este projeto
pRL390	Fragmento SpeI-KpnI de 680 pb de pRL300 clonado em pUJ142 para gerar uma fusão de tradução entre <i>chrR</i> e os primeiros 151 códonos do gene <i>xytX</i>	este projeto
pRL400	Fragmento de 1031 pb contendo <i>sigT</i> clonado em pGEM-T	este projeto
pRL480	Fragmento KpnI-PstI de 1052 pb de pRL400 clonado em pJS14 para expressão constitutiva de <i>sigT</i> a partir do promotor P _{lacZ}	este projeto
PRL500	Fragmento de 497 pb contendo CC3476 clonado em pGEM-T	este projeto
PRL580	Fragmento EcoRI-PstI de 497 pb de pRL500 clonado em pJS14 para expressão constitutiva de CC3476 a partir do promotor P _{lacZ}	este projeto
pCM7	Região codificadora de <i>sigU</i> clonada em pJS14 para expressão constitutiva deste gene a partir do promotor P _{lacZ}	(Alvarez-Martinez <i>et al.</i> , 2007)
pRSR	pRKlacZ290 contendo uma fusão transcricional entre <i>lacZ</i> e o promotor de <i>sigR</i> (518 bp a montante do início de tradução)	R.C.G. Simão
pCM63	pRKlacZ290 contendo uma fusão transcricional entre <i>lacZ</i> e a região promotora de <i>sigT</i> (436 bp a montante do início de tradução)	(Alvarez-Martinez <i>et al.</i> , 2007)
pRB72	pRKlacZ290 contendo uma fusão transcricional entre <i>lacZ</i> e a região promotora de <i>sigU</i> (600 bp a montante do início de tradução)	(Alvarez-Martinez <i>et al.</i> , 2007)
pRSE	pRKlacZ290 contendo uma fusão transcricional entre <i>lacZ</i> e a região promotora de <i>sigE</i> (498 bp a montante do início de tradução)	R.C.G. Simão

Tabela 2. Lista de oligonucleotídeos

Nome do Primer	Seqüência (5'-3') ^a	Uso no presente trabalho
sigR 5'	TATGAATTCAATCAGGCGCGGAACGTT	Construção da linhagem SG200
sigR-del 5'	TATGGATCCCATGCCCCACTATACGGAG	Construção da linhagem SG200
sigR-del 3'	TATGGATCCCGCTTTGGCATGATGAA	Construção da linhagem SG200
sigR 3'	TATCTGCAGTGTCTCAGAAGGAGCCTAGA	Construção da linhagem SG200 e expressões constitutiva e regulada de <i>chrR</i> em <i>C. crescentus</i>
chrR 5'	TATGAATTCGCGCTCGAACAGCGCCGC	Construção das linhagens SG250 e SG251
chrR-del 5'	TATCTCGAGCAGGTGCGTGGCCACGAC	Construção das linhagens SG250 e SG251
chrR-del 3'	TATCTCGAGCGCGTGGTCTCCAGCAAG	Construção das linhagens SG250 e SG251
chrR 3'	TATCTGCAGGCGCCAGCCGATGATCTG	Construção das linhagens SG250, SG251, SG252, SG253 e SG254 e investigação do operon CC0646/ <i>chrR</i>
msrA 5'	TATGAATTCAGACCTTGCGCAACGCCA	Construção das linhagens SG210 e SG213
msrA-del 5'	TATGGATCCACGATCAGGCGGCGCATC	Construção das linhagens SG210 e SG213
msrA-del 3'	TATGGATCCCGACGCGCGCCTCAAGCA	Construção das linhagens SG210 e SG213
msrA 3'	TATACTAGTGGACCTCATAGACCTTCT	Construção das linhagens SG210 e SG213
cfaS 5'	TATCTGCAGTGAACACCTGACCGACGT	Construção da linhagem SG211
cfaS-del 5'	TATCTCGAGGAGCGCGGTTTGCAAGTC	Construção da linhagem SG211
cfaS-del 3'	TATCTCGAGCTATGGCGGTTCTATCTC	Construção da linhagem SG211
cfaS 3'	TATACTAGTGATTGGCCGTGATCCGAC	Construção da linhagem SG211
CC2258 5'	TATACTAGTCATACTTGCTGCGGTCTGA	Construção das linhagens SG212 e SG213
CC2258-del 5'	TATCTCGAGCGTACGCATAGGGTCAGA	Construção das linhagens SG212 e SG213
CC2258-del 3'	TATCTCGAGTAACCCGCAGCCCTGCTG	Construção das linhagens SG212 e SG213
CC2258 3'	TATGAATTCATCTGACCCAGGCCGACT	Construção das linhagens SG212 e SG213
C186S F	TCTCCAGCAAGCCGAGCCTGTGCGTG	Construção da linhagem SG252
C186S R	CACGCACAGGCTCGGCTTGCTGGAGA	Construção da linhagem SG252 e investigação do operon <i>chrR/sigR</i>
C188S F	TCTCCAGCAAGCCGTGCCTGAGCGTG	Construção da linhagem SG253
C188S R	CACGCTCAGGCACGGCTTGCTGGAGA	Construção da linhagem SG253

C186-188S F	TCTCCAGCAAGCCG AGCCTGAGCGTG	Construção da linhagem SG254
C186-188S R	CACGCTCAGGCTCGGCTTGCTGGAGA	Construção da linhagem SG254
chrRF	TAT GGATT CGTCGTGAGCCTGCGTCGT	Expressões constitutiva e regulada de <i>chrR</i> em <i>C. crescentus</i>
chrRF2	ACTGCCGGGTGATCCTGCTGA	Investigação do operon CC0646/ <i>chrR</i>
sigRF	TAT GAATT CACATCGCGTACGCGGAAC	Expressão constitutiva de <i>sigR</i> em <i>C. crescentus</i> , expressão de His- σ^R em <i>E. coli</i> e construção das linhagens SG252, SG253 e SG254
sigRF2	CGCAATCTGCGCATCGAC	Investigação do operon <i>chrR/sigR</i>
sigRR	TAT GGTAC CTGGGCAGACGACGCAGGC	Expressão constitutiva de <i>sigR</i> em <i>C. crescentus</i> , expressão de His- σ^R em <i>E. coli</i> e 5'RACE dos genes CC0646-CC0648
sigE 3'	TAT GGATC CAGACGTCGGCCCGCGTGA	Construção da linhagem SG100
sigE del 3'	TTAT CTCGAG CTCTCGCGTCGTGTCAAG	Construção da linhagem SG100
sigE del 5'	TTAT CTCGAG ATTCAGCGCCACGCGGTG	Construção da linhagem SG100
sigE 5'	TAT GAATT CGTCCATTGGCGCGACGGA	Construção da linhagem SG100
sigE F	TATT CTCGAG GACGCTGACAAGGATCGC	Expressão constitutiva de <i>sigE</i> em <i>C. crescentus</i>
sigE R	TAT GGATC CCCTTCATCACGCTTCGCC	Expressão constitutiva de <i>sigE</i> em <i>C. crescentus</i>
CC3476 3'	TAT CTGCAG GGATCGTACGGAGTCGTC	Expressão constitutiva de <i>sigT</i> em <i>C. crescentus</i>
CC3476 del 3'	TAT CTCGAG TCCTCCGCAAGGCCGAGC	Expressão constitutiva de <i>sigT</i> em <i>C. crescentus</i>
CC3476F	CGGCGTCGAGGACATGAT	Investigação do operon CC3476/ <i>sigT</i>
CC3476R	GCGGGCAGCATCGACA	Investigação do operon CC3476/ <i>sigT</i>
placsigTF	CAAGCGAGCAAGAAGA	Expressão constitutiva de CC3476 em <i>C. crescentus</i>
placsigTR	CGCTTGAAGCTGTTGT	Expressão constitutiva de CC3476 em <i>C. crescentus</i>
CC0459SP1	CCATGTGGTGCTCGCAGT	5'RACE do gene C0459
CC0459SP2	GATAGCCGGCGAACCACT	5'RACE do gene C0459
CC0459SP3	CATGGCCTCGTCCTTGGA	5'RACE do gene C0459
CC0648SP2	CGTCTGTCATGCCGCTGAGA	5'RACE dos genes CC0646-CC0648
CC0648SP3	GGCCGCCGACGGGGTCGAG	5'RACE dos genes CC0646-CC0648
CC1428SP1	CGTAGAGGCGGTTCCAGA	5'RACE dos genes CC1427-CC1428
CC1428SP2	GCTTGGTCCCGAGTGTCT	5'RACE dos genes CC1427-CC1428
CC1428SP3	GAATGTAGAGCGGGATCA	5'RACE dos genes CC1427-CC1428
CC0088F	GTGGCGAGAATCATGCGC	qRT-PCR
CC0088R	TTCATTGTGGCTGCCCG	qRT-PCR
CC0646F	TCGGCTCCAAGCCCTATG	qRT-PCR

CC0646R	GCCGCTTTTTCACGTCGTA	qRT-PCR
CC1039F	CGGCGCAGACCTTCTATCTG	qRT-PCR
CC1039R	CGGTGCGATAGGCGAAGTAG	qRT-PCR
CC1427F	CGCAAGGACGGCTTTGAC	qRT-PCR
CC1427R	AACCCGGCCTCGCAATAG	qRT-PCR
CC1428F	GCCCTACTTCCGGATCTTCAA	qRT-PCR
CC1428R	ACCCAACGCCGGACATAGT	qRT-PCR
CC2600F	GTGTCGAGCGGCCCTACTT	qRT-PCR
CC2600R	TCATAGACCTGATCGTGCATCAG	qRT-PCR

3.2. Meios e condições de crescimento

As linhagens de *E. coli* foram crescidas a 37°C em meio LB (triptona 10 g/l, extrato de levedura 5 g/l e NaCl 10 g/l, pH 7,5), acrescido de ampicilina (100 µg/ml), canamicina (50 µg/ml), cloranfenicol (30 µg/ml) ou tetraciclina (12,5 µg/ml) para seleção de colônias portadoras de plasmídeo com marca de resistência. Já as cepas de *C. crescentus* foram cultivadas a 30°C em meio PYE (peptona 2 g/l, extrato de levedura 1 g/l, MgSO₄.7H₂O 0,2 g/l e CaCl₂ 0,5 mM) ou M2 (Mg₂HPO₄ 18 mM, KH₂PO₄ 8 mM, NH₄Cl 9 mM, FeSO₄ 10 µM, MgSO₄ 2 mM, CaCl₂ 0,5 mM e glicose 0,2%) suplementado ou não com ácido nalidíxico (20 µg/ml), canamicina (10 µg/ml), tetraciclina (2 µg/ml), cloranfenicol (1 µg/ml), D-glicose 0,2%, D-xilose 0,2% ou sacarose 3%. Os meios sólidos contêm adicionalmente 1,5% de ágar. Estoques de *E. coli* e *C. crescentus* foram realizados em 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) e mantidos a -80°C.

3.3. Reações de amplificação de DNA por PCR

Nas reações de PCR foram usadas quantidades de DNA molde entre 25 e 100 ng e oligonucleotídeos na concentração de 0.2 pmol/µl. Temperaturas de hibridização dos primers ao DNA variando de 48 a 55°C, e concentrações de MgCl₂ entre 1 e 2 mM foram usadas nessas reações de amplificação, dependendo do conjunto de primers. Tais reações utilizam a enzima Taq DNA polimerase.

3.4. Isolamento de plasmídeos e fragmentos de DNA, digestão com enzimas de restrição, ligação e seqüenciamento

Os plasmídeos foram extraídos das bactérias pelo método de lise alcalina, como descrito previamente (Miller, 1972). O isolamento de fragmentos de DNA de interesse foi realizado através de eletroeluição em tampão TBE (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM, pH de 8.0) 0,5x numa tensão de 100 V, seguido de uma purificação com fenol-clorofórmio (1:1) e precipitação com acetato de sódio e etanol. As digestões de DNA foram feitas com enzimas de restrição obtidas da New England Biolabs, Invitrogen ou Fermentas, sendo utilizadas com os tampões fornecidos pelos fabricantes. Os fragmentos resultantes da amplificação por PCR ou da digestão foram analisados por eletroforese em gel de agarose em tampão TBE, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz UV.

As ligações foram feitas utilizando vetor e fragmentos de DNA na proporção de 1:3, todos digeridos com as enzimas de restrição adequadas. Tais reações de ligação utilizam a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen ou Promega).

O seqüenciamento de DNA foi feito em seqüenciador automático ABI377 pelo método "Big Dye Terminator" (Applied Biosystem).

3.5. Transformação e conjugação

A transformação de *E. coli* com plasmídeos foi realizada por eletroporação, seguida de recuperação das células em meio SOC (triptona 20 g, extrato de levedura 5 g, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM e glicose 0,35%) por uma hora e plaqueamento em LB contendo o antibiótico para seleção dos transformantes. No preparo de células competentes para eletroporação, culturas saturadas foram diluídas 100x em meio 2xTY. Após o crescimento até a fase exponencial, essas culturas foram coletadas por

centrifugação e lavadas duas vezes em glicerol 10%. Em seguida, o precipitado foi ressuspensionado em 3 ml de glicerol 10%, aliquoteado e mantido a -80°C .

A inserção de plasmídeos em *C. crescentus* foi feita através da conjugação desta bactéria com a linhagem doadora S17-1 de *E. coli*. Para isso, as cepas doadora (que recebeu, por transformação, o plasmídeo de interesse) e receptora foram misturadas em placas de PYE e incubadas por 8-16 horas a 30°C para permitir a transferência do plasmídeo para *C. crescentus*. Após esse tempo, a seleção foi feita em placas de PYE contendo ácido nalidíxico 20 $\mu\text{g/ml}$ (seleção positiva apenas para *C. crescentus*, já que *E. coli* S17-1 é sensível a essa substância) e o antibiótico para seleção de células portadoras do plasmídeo (canamicina, tetraciclina ou cloranfenicol).

3.6. Estratégia usada para a obtenção de linhagens mutantes em *C. crescentus*

A fim de evitar um possível efeito polar sobre as ORFs localizadas a jusante de *sigR* (CC0648), *chrR* (CC0647), *msrA* (CC1039), *cfaS* (CC1427) e *sigE* (CC2751), deleções mantendo os quadros de leituras das proteínas codificadas por esses genes foram construídas. Embora CC2258 constitua uma unidade de transcrição monocistrônica, o mesmo tipo de deleção foi usado para inativar tal gene. Em cada caso, a maior parte da região codificadora do gene foi deletada, como segue: *sigR* (182 aminoácidos ou 89% de σ^R), *chrR* (146 aminoácidos ou 69% de ChrR), *cfaS* (370 aminoácidos ou 90% de CfaS), *msrA* (180 aminoácidos ou 92% de MsrA), CC2258 (148 aminoácidos ou 97% da proteína) ou *sigE* (174 aminoácidos ou 94% de σ^E). Para criar cópias truncadas desses genes, fragmentos flanqueando a região a ser deletada foram amplificados por PCR e ligados diretamente no vetor pGEM-T. Após serem liberados desse vetor por digestão, os fragmentos foram clonados simultaneamente no plasmídeo pNPTS138, o que foi possível devido à presença de um mesmo sítio

de restrição na extremidade 3' do fragmento a montante da região de deleção e na extremidade 5' do fragmento a jusante da mesma.

Para a substituição individual ou simultânea dos códons C186 e C188 de ChrR por um dos códons correspondentes a serina, um par de oligonucleotídeos complementares entre si e que contém os respectivos nucleotídeos alterados foi construído em cada caso. Esses oligonucleotídeos foram usados separadamente em reações de PCR com outro primer na orientação inversa (P1 ou P4). Uma vez que os dois fragmentos obtidos se sobrepõem parcialmente na região correspondente aos oligonucleotídeos contendo as substituições, ambos foram usados como molde em outra reação de PCR contendo apenas os primers P1 e P4. O produto dessa reação foi ligado no vetor pGEM-T e seqüenciado para confirmar a presença das mutações pontuais e certificar-se de que essas são as únicas mutações geradas. O fragmento foi então isolado do plasmídeo por digestão e clonado no vetor pNPTS138.

O vetor pNPTS138 portando uma cópia mutada do gene em questão foi então inserido na cepa S-17-1 de *E. coli*, e transferido por conjugação para a linhagem parental NA1000 de *C. crescentus*. O plasmídeo pNPTS138 possui um gene de resistência a canamicina e o gene de seleção *sacB* de *B. subtilis* que codifica a enzima levansucrase, responsável pela conversão da sacarose adicionada ao meio em um produto tóxico para a célula. Além disso, o vetor é capaz de se replicar em *E. coli*, mas atua como suicida em *C. crescentus* devido à incapacidade de permanecer nas células de forma autônoma. Dessa forma, é necessária a integração do plasmídeo no genoma de *C. crescentus* para a permanência do mesmo na bactéria, o que é conseguido por meio de recombinação homóloga entre o DNA plasmidial e o cromossômico (Fig. 2).

Figura 2. Representação esquemática dos eventos de recombinação homóloga ocorridos durante a obtenção das linhagens mutantes de *C. crescentus*. A) primeira recombinação ocorreu a 5' da deleção. B) primeira recombinação se deu a 3' da deleção. São mostradas as posições das quebras cromossômicas e as regiões de pareamento entre o plasmídeo e o DNA genômico. (não esquematizado em escala). Embora tenha sido baseado no uso de cópias contendo deleções internas das regiões codificadoras dos genes, o esquema também pode ilustrar os eventos de recombinação ocorridos durante a substituição da cópia original por cópias contendo alterações nucleotídicas.

Após a conjugação, uma das colônias obtidas foi inoculada em meio sem o antibiótico canamicina, para selecionar o segundo evento de recombinação. Neste segundo evento, selecionam-se as células que perderam o plasmídeo e uma das cópias do gene em questão, a original ou a mutada, dependendo da posição da quebra cromossômica em relação à região deletada ou alterada. Assim, foram selecionadas colônias capazes de crescer na presença de sacarose e que mostraram sensibilidade após a adição de canamicina ao meio. Dentre essas colônias, algumas consistem em mutantes (perderam a cópia original do gene), enquanto as demais representam colônias da linhagem parental (eliminaram a cópia truncada ou a cópia contendo as alterações de nucleotídeos) (Fig. 2). Para distingui-las, o DNA de tais colônias foi usado em reações de PCR, onde a distinção pôde ser feita com base na diferença de tamanho entre as cópias original e truncada ou no padrão de restrição do gene.

Para a construção do duplo mutante nos genes *msrA* e CC2258, o plasmídeo pNPTS138 carregando a cópia truncada do gene *msrA* foi inserido por conjugação na linhagem mutante em CC2258 (SG213). Colônias que passaram sucessivamente pelos dois eventos de recombinação, resultando na substituição da cópia original de *msrA* pela sua equivalente truncada, foram selecionadas como descrito acima.

A fim de se obter uma linhagem mutante condicional em *chrR*, uma cópia desse gene sob controle de um promotor dependente de xilose (P_{xylX}) foi construída. Para isso, a região codificadora de *chrR* foi amplificada por PCR e clonada inicialmente em pGEM-T, obtendo a construção pRL300. Após ser liberado do vetor, o fragmento contendo o gene *chrR* foi ligado no vetor pUJ142. A construção resultante, que consiste numa fusão de tradução entre os 151 primeiros códons do gene *xylX* e a região codificadora completa de *chrR*, foi transferida por conjugação para células de *C. crescentus* contendo a cópia truncada desse gene inserida no genoma da bactéria juntamente com o plasmídeo pNPTS138. O segundo evento de recombinação foi realizado na presença de glicose 0,2 % ou xilose 0,2 %.

Para superexpressar *sigR*, *chrR*, *sigE* ou *sigT* em células da linhagem parental NA1000 de *C. crescentus*, fragmentos correspondente às regiões codificadoras desses genes foram amplificados por PCR e ligados individualmente no vetor pGEM-T. Após a liberação do vetor através de digestão, cada um dos fragmentos foi clonado no plasmídeo pJS14, gerando fusões de transcrição entre as regiões codificadoras desses genes e um promotor com atividade constitutiva, P_{lacZ}. Essas construções foram introduzidas individualmente em *C. crescentus* através de conjugação com a cepa S17-1 de *E. coli*.

3.7. Ensaio de atividade da enzima β -galactosidase

Para determinar a atividade promotora dos genes *sigR*, *sigT*, *sigU* e *sigE*, foram utilizadas construções já disponíveis, onde a região regulatória de cada gene foi clonada a montante do gene repórter *lacZ* no plasmídeo placZ290, em fusão de transcrição. Essas construções foram inseridas isoladamente nas diferentes linhagens de *C. crescentus* através de conjugação com a cepa S17-1 de *E. coli*.

Na análise do efeito dos níveis de *chrR* sobre a atividade promotora de *sigR*, culturas saturadas de células contendo a construção pRSR e crescidas na presença de D-xilose 0,2% foram lavadas três vezes e ressuspensas em meio PYE. Essas culturas foram então diluídas para DO₆₀₀ de 0,1 em PYE suplementado com D-glicose ou D-xilose na concentração final de 0,2%. Os ensaios de atividade da enzima β -galactosidase foram realizados 4 h após a remoção da D-xilose. Nos demais experimentos, culturas saturadas de *C. crescentus* contendo uma das fusões com o gene *lacZ* foram diluídas para DO₆₀₀ de 0,1, crescidas até atingirem a fase exponencial (cerca de 4 h) e então analisadas em ensaios enzimáticos ou submetidas à condição de estresse de interesse antes desta análise. No último caso, as culturas foram tratadas com etanol 15%, H₂O₂ (0.05-1.0 mM), paraquat (0.05-0.5 mM), diamida (0.01-5.0 mM), *tert*-butil hidroperóxido (0.01-1.0 mM), azul de metileno ou riboflavina (ambos em concentrações finais variando de 0.1 a 10 μ M) na presença ou ausência de luz branca (6 W/m², como

mensurado a partir de um radiômetro modelo IL1700- International Light Inc.), FeSO₄, CuSO₄, ZnSO₄, CoSO₄, CdSO₄ e NiCl₂ (todos em concentrações finais variando de 10 µM a 1mM) ou submetidas à temperatura de 40°C. Nas análises de carência de carbono ou nitrogênio, culturas saturadas de *C. crescentus* crescidas em M2 contendo glicose foram diluídas para DO₆₀₀ de 0,1 e crescidas até atingirem a fase exponencial. Essas culturas foram então lavadas três vezes e as células foram resuspendidas em M2 sem glicose ou sais de amônia para induzir carência de carbono ou glicose, respectivamente. O crescimento em M2 também foi usado para investigar o efeito dos tratamentos com NaCl 85 mM ou sacarose 150 mM sobre a atividade das regiões promotoras analisadas. Os demais experimentos foram realizados em meio PYE. Como controle, uma cultura de células não-exposta à condição de estresse foi mantida em todos os casos. Os ensaios de atividade da enzima β-galactosidase foram realizados invariavelmente após 1, 2, 3 e 4 h após o início do estresse e, no caso do tratamento com *tert*-butil hidroperóxido 100 µM, análises similares foram também realizadas após 15 e 30 min.

A atividade da enzima β-galactosidase foi mensurada como descrito previamente (Miller, 1972), sendo os resultados expressos em unidades de atividade da enzima (unidades Miller), calculado como segue:

$$\text{atividade} = \frac{1000 \times \text{DO}_{420}}{V \times T \times \text{DO}_{600}}$$

onde, V corresponde ao volume (ml) de cultura utilizado, T (min) é o tempo de incubação da enzima na presença do substrato orto-nitrofenil-galactopiranosídeo, DO₄₂₀ refere-se à leitura de absorbância a 420 nm realizada após a reação da enzima β-galactosidase com o seu substrato (estimativa da concentração de produto da reação) e DO₆₀₀ corresponde à leitura de absorbância a 600 nm realizada na cultura de células usada para o ensaio enzimático (turbidez da cultura). Uma vez que azul de

metileno absorve luz ao redor de 600 nm, a turbidez de culturas contendo este sensibilizador foi monitorada a 500 nm e os resultados foram normalizados usando a DO₆₀₀ mensurada da cultura não-tratada.

3.8. Expressão de σ^R recombinante em *E. coli*

Para a obtenção de uma proteína σ^R recombinante, o fragmento correspondente à região codificadora de *sigR* foi isolado por digestão da construção pRL200 e subclonado no vetor de expressão pPROEX-Hta, a fim de expressar o fator sigma σ^R como uma proteína de fusão com uma cauda N-terminal contendo seis resíduos de histidina (esses resíduos são codificados pelo vetor).

Para a extração da proteína recombinante em larga escala, culturas saturadas da linhagem DH5- α de *E. coli* contendo a construção pRL270 foram diluídas 100x em LB contendo ampicilina e crescidas até a fase exponencial. A expressão das proteínas recombinantes foi então induzida através da adição de isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) 1 mM. Após 3 h de incubação na presença de IPTG, as células foram coletadas por centrifugação, ressuspensas em 2 ml de tampão de lise (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, imidazol 10 mM e PMSF 0,5 mM) e sonificadas no aparelho Branson Sonifier 450 através de 3 pulsos de 30 s na potência 3. Os lisados foram centrifugados, separando-se o sobrenadante do precipitado. Amostras de cada uma das frações foram analisadas em gel SDS-PAGE, sendo a proteína His₆- σ^R detectada no precipitado, como corpos de inclusão.

3.9. Purificação de His₆- σ^R e obtenção do anticorpo anti- σ^R

A proteína His₆- σ^R foi purificada a partir do corpo de inclusão como descrito previamente (Marshak *et al.*, 1996). Para isso, o precipitado foi lavado 3 vezes com tampão de A (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 50 mM, EDTA 0,5 mM e glicerol 5%) com o detergente DOC (deoxicolato de sódio) 2%. Em seguida, a

proteína recombinante foi solubilizada pela adição de detergente sarcosil 0.3% e a preparação, cujo volume foi aumentado para 50ml através da adição de tampão A, foi dialisada a 4°C por 16 h. Posteriormente, a proteína foi concentrada até cerca de 5 ml em Centriprep 10 (Amicon) e quantificada pelo uso de FeSO₄.5H₂O e ácido bicinconínico, tendo BSA 1µg/ µl como padrão.

Antes da primeira injeção da proteína His₆-σ^R em coelho, 3 ml de sangue foram retirados para a obtenção do soro pré-imune. Cerca de 500 µg dessa proteína foram injetados, sendo este procedimento repetido outras duas vezes com intervalo de aproximadamente um mês entre as injeções. Em cada uma destas injeções, 0,5 ml da proteína foi misturado com o mesmo volume de adjuvante de Freund completo (primeira injeção) ou incompleto (demais injeções) (Sigma Aldrich). Um mês após a última injeção foi realizada a retirada de aproximadamente 15 ml de sangue para a obtenção de grande quantidade de soro. O sangue retirado foi incubado por 30 min a 37°C e, em seguida por 30 min no gelo, sendo posteriormente centrifugado a 3000 g por 15 min a 4°C para a separação do coágulo. O soro foi recolhido, aliquotado e estocado a -20°C.

3.10. Western blot

Para a obtenção dos extratos protéicos totais usados na análise dos níveis de σ^R no mutante condicional em *chrR*, culturas de *C. crescentus* foram cultivadas como descrito acima. Nos demais experimentos, culturas saturadas de *C. crescentus* foram diluídas para DO₆₀₀ de 0,1, crescidas até atingirem a fase exponencial (cerca de 4 h) e então usadas para a obtenção dos extratos protéicos totais ou tratadas com D-xilose 0,2%, *tert*-butil hidroperóxido 100 µM, CdSO₄ 25 µM na presença ou não de ZnSO₄ (adicionado nas concentrações finais de 25 a 250 µM) ou azul de metileno 2,5 µM na presença de luz branca (6 W/m²). Células expostas a essa última condição de estresse foram também transferidas para um ambiente sem luz. Similarmente, uma cultura de *C. crescentus* foi irradiada com

luz UVA numa taxa de 78 W/m^2 por 17 min (dose total de 80 kJ/m^2). Para isso, 10 ml de cultura foram adicionados em placas Pyrex e mantidos sob uma lâmpada de radiação UVA (OSRAM ULTRAMED FDA KY10s 1000W) com pico de emissão em 365 nm. A luz UVA foi transmitida através de um filtro que bloqueia a passagem de radiação UVB (BG39, Shott).

Proteínas separadas eletroforéticamente em gel SDS-PAGE foram transferidas para filtro de nitrocelulose, como descrito previamente (Towbin *et al.*, 1992). Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S 0,1% diluído em ácido acético 10%, para visualização das proteínas, e bloqueada por cerca de 30 min em TBS (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e NaCl 150 mM) contendo 5% de leite desnatado. Posteriormente, a membrana foi incubada a 4°C por 16 horas em solução TBS contendo 0,03% de Triton X-100, 0,02% de Tween-20 e o anticorpo na diluição de 1: 250. Após essa incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada quatro vezes em TBS-T (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 150 mM e Tween-20 0,05%) por 5 min e uma vez em TBS por 10 minutos, procedendo-se então à incubação com o anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina, seguido de nova lavagem como descrito acima.

Para revelação com fosfatase alcalina, foram utilizados BCIP (5-bromo-4-cloro-6-indolil fosfato, 0,3 mg/ml) e NBT (nitroblue tetrazolium, 0,15 mg/ml) em tampão contendo Tris-HCl 10 mM pH 9,0, NaCl 100 mM e MgCl_2 5 mM.

3.11. Testes de viabilidade e curvas de crescimento

Nas análises de sensibilidade, culturas saturadas de *C. crescentus* foram diluídas para DO_{600} de 0,1 e incubadas por 4 h, atingindo a fase exponencial de crescimento ($\text{DO}_{600} \cong 0.5$). Para testar o efeito de $^1\text{O}_2$ sobre a viabilidade das linhagens, azul de metileno ($2,5\text{-}5.0 \mu\text{M}$) foi adicionado e as culturas foram então expostas à luz branca (6 W/m^2) ao longo do experimento. Como controle, culturas foram

expostas à luz branca na ausência do sensibilizador. Em ambos os experimentos, alíquotas foram retiradas antes e após 16, 20 e 24 h do início do estresse. A fim de testar o efeito de outras condições de estresse oxidativo, culturas de *C. crescentus* foram tratadas com CdCl_2 (0,025-0,25mM), paraquat (0,2-5mM), H_2O_2 (2,5-5mM) ou *tert*-butil hidroperóxido (0,1-1mM) e alíquotas foram retiradas antes e após 1, 2, 4 e 24 h do início do estresse. Adicionalmente, células foram expostas ao etanol 15 % ou à temperatura de 42°C e alíquotas retiradas antes e após 15, 30, 45 e 60 min do início do estresse. As análises de viabilidade foram realizadas a partir de culturas crescendo em meio PYE, com exceção do estresse osmótico, o qual foi testado usando meio M2. Neste caso, culturas em fase exponencial de crescimento foram submetidas ao estresse pela adição de NaCl 85mM ou sacarose 100-150 mM e alíquotas foram retiradas antes e após 2, 4, 8, 10 e 24 ou 2, 4, 6 e 8 h do início do estresse, respectivamente. O número de unidades formadoras de colônia (UFC) foi obtido por meio do plaqueamento das alíquotas em PYE e o efeito do estresse sobre cada linhagem foi estimado com base na variação do número de UFC ao longo da exposição ao estresse.

Para obtenção de curvas de crescimento da linhagem mutante condicional em *chrR* na presença de D-glicose ou D-xilose, as culturas foram crescidas em PYE contendo um desses açúcares na concentração final de 0,2 % após as lavagens das culturas saturadas como descrito acima. Alíquotas foram retiradas a cada duas horas para dosagem da turbidez da cultura (DO_{600}). As demais curvas de crescimento foram obtidas a partir de culturas diluídas crescendo na ausência de qualquer açúcar.

Nas análises de crescimento das linhagens em meio sólido, culturas saturadas foram diluídas em PYE para DO_{600} de 0,1 e incubadas até atingirem a fase exponencial (cerca de 4h). Alíquotas foram retiradas, diluídas sucessivamente e 3µl de cada diluição foram usados no plaqueamento em PYE.

3.12. Obtenção de RNA total

Para a obtenção do RNA usado na análise dos níveis de mRNA de *chrR* em células da linhagem NA1000 ou SG250, culturas de *C. crescentus* foram cultivadas como descrito acima. Nos demais experimentos, culturas saturadas de *C. crescentus* foram diluídas para DO₆₀₀ de 0,1, crescidas até atingirem a fase exponencial (cerca de 4 h) e então usadas para a extração do RNA total ou tratadas com D-xilose 0,2% ou azul de metileno 2,5 µM na presença de luz branca (6 W/m²) por 30 min antes da extração.

Para a extração das amostras de RNA total, as células foram lisadas em 1 ml de Trizol (Invitrogen). Após centrifugação, a fase contendo o RNA foi extraída e submetida à precipitação por isopropanol através da incubação a -80°C durante 16 h. As amostras foram centrifugadas e o precipitado foi lavado com etanol 75%, secado e armazenado a -80°C. A concentração de RNA foi estimada através da medida de absorbância a 260 nm, sendo sua integridade analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão MOPS (ácido 3-[N-morfolino]propanosulfônico) 20 mM pH 7,0, contendo acetato de sódio 5 mM, EDTA 0,1 mM e formaldeído 3,5%.

As amostras de RNA foram tratadas com DNase I com a finalidade de eliminar possíveis contaminações com DNA. Após esse tratamento, tais amostras foram novamente analisadas em gel de agarose e usadas como molde em reação de amplificação para confirmar a ausência de DNA contaminante.

3.13. Microarranjos de oligonucleotídeos

Nesses experimentos, o RNA total ($\cong$ 20 µg) extraído como descrito acima foi usado para a síntese de cDNA na presença da enzima SuperScript III, de primers randômicos de 6 nucleotídeos e de dUTP modificado. Após a purificação, esses cDNAs foram marcados diferentemente através da ligação dos

fluoróforos Alexa Fluor 555 ou Alexa Fluor 647 (correspondendo ao Cy3 e Cy5, respectivamente) ao nucleotídeo modificado. Os fluoróforos não incorporados foram removidos numa nova etapa de purificação e os cDNAs foram usados para hibridização competitiva por 8 horas a 44°C em lâminas contendo oligonucleotídeos 50mer correspondentes a todas as 3767 ORFs preditas no genoma de *C. crescentus* segundo a TIGR, gentilmente cedidas pelo Dr. M. Laub (MIT). Após lavagens com soluções contendo SDS, SSC e DTT, essas lâminas foram escaneadas. Os dados foram então analisados pelo programa SpotWhat (Koide *et al.*, 2006), onde pontos contendo “flags” ou com intensidade de fluorescência menor que o ‘background’ foram excluídos da análise posterior. A normalização desses dados foi realizada pelo método de LOWESS (“locally weighted regression”) (Yang *et al.*, 2002). Genes cuja razão entre as intensidades de expressão observadas na cepa superexpressando σ^R e na linhagem parental NA1000 foi maior que 1,5 ou menor que 0.67 em pelo menos 75% das réplicas biológicas (3 dos 4 experimentos realizados) foram assumidos como diferencialmente expressos entre as linhagens analisadas.

3.14. RT-PCR quantitativo

As seqüências dos oligonucleotídeos usados nos experimentos de RT-PCR quantitativo (Tabela 2) foram obtidas através do programa PrimerExpress (Applied Biosystems). Inicialmente, o cDNA foi sintetizado a partir de 5 µg de RNA, 500ng de primers randômicos e Superscript II, segundo instruções do fornecedor (Invitrogen). Cerca de 180 ng desse cDNA foram usados para a amplificação quantitativa na presença de 800 nM de cada oligonucleotídeo e 10 µl de Platinum SYBR Green (Applied Biosystems). Como normalizador desses experimentos, foi utilizado o gene CC0088 já que sua expressão não variou significativamente nas análises de microarranjos. A presença de produtos inespecíficos e a formação de dímeros entre os oligonucleotídeo foi monitorada através da curva de

dissociação fornecida pelo sistema ABI 7500 (Applied Biosystems). A expressão relativa de cada gene entre as duas linhagens foi determinada usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

3.15. RACE 5'

O início de transcrição dos genes selecionados foi identificado usando o kit 3'/5' RACE (Roche). Nesses experimentos, o cDNA ($\cong 2 \mu\text{g}$) foi obtido usando um oligonucleotídeo que hibridiza especificamente ao mRNA de interesse. Após a purificação do cDNA, uma cauda poli(A) foi adicionada a sua extremidade 3', através da transferência de nucleotídeos de adenina. Em seguida, o cDNA foi usado como molde numa reação de amplificação na presença de um outro primer específico, o qual hibridiza mais próximo à cauda poli(A) que o oligonucleotídeo usado anteriormente. Nessa reação, também estava presente um primer que consiste em 16 nucleotídeos de timina seguidos por uma sequência âncora. O produto da reação de PCR foi então submetido a uma segunda reação de amplificação usando um primer que hibridiza na sequência âncora e outro que se liga ainda mais próximo da cauda poli(A). Finalmente, o produto desta reação de PCR foi ligado ao vetor pGEM e um total de 8 clones foram seqüenciados em cada caso para a identificação do nucleotídeo presente logo após a sequência de timinas, o qual corresponde ao início de transcrição do gene analisado.

4. Resultados

4.1. Caracterização do papel do gene *sigR* na resposta a estresses ambientais

4.1.1 Organização genômica de *sigR*

O gene *sigR* de *C. crescentus* (CC0648), que codifica o fator sigma ECF σ^R , localiza-se no genoma a montante de dois outros genes, todos sendo transcritos na mesma orientação (Fig. 3A). A proteína com função conhecida que compartilha maior similaridade (58,5%) e identidade (39,5%) com σ^R é σ^E (ou RpoE) de *Rhodobacter sphaeroides* (Fig. 4A), um fator sigma ECF envolvido na resposta desta bactéria ao estresse induzido por oxigênio singlete (Anthony *et al.*, 2005). Da mesma forma, a proteína codificada pelo gene localizado a jusante de *sigR* é significativamente similar (65,7% de similaridade e 38% de identidade) ao fator anti-sigma ChrR de *R. sphaeroides* (Fig. 4B), o qual mantém σ^E num estado inativo durante o crescimento normal desta bactéria (Newman *et al.*, 1999). Como observado para outros genes que codificam fatores sigma ECF, o códon de parada do gene *sigR* está sobreposto ao códon de início de *chrR* (CC0647), sugerindo que eles sejam co-transcritos. O terceiro gene dessa provável unidade de transcrição de *C. crescentus* (CC0646) encontra-se separado de *chrR* por apenas 12 pb e codifica uma proteína pertencente à família das fotoliasas/criptocromos (Fig. 3A). Análise de hidropaticidade das seqüências protéicas inferidas a partir de *chrR* e CC0646 revelaram a ausência de possíveis segmentos transmembrana nos produtos protéicos destes genes, sugerindo uma localização citoplasmática para os mesmos (dados não mostrados). Os genes *rpoE* e *chrR* de *R. sphaeroides* também estão organizados em uma possível unidade de transcrição, onde *rpoE* aparece como o primeiro gene desse operon. Adicionalmente, uma proteína similar (75,8% de similaridade e 53,2% de identidade) àquela codificada pelo gene CC0646 de *C. crescentus* está presente em *R. sphaeroides*, embora o gene que a codifique não pertença à mesma unidade de transcrição formada por *rpoE* e *chrR*.

Figura 3. Organização genômica de *sigR*. A) Representação esquemática da possível unidade de transcrição formada pelos genes *sigR* (CC0648), *chrR* (CC0647) e CC0646. A região codificadora, o nome do locus e a função predita para o produto protéico de cada gene mapeado nesse operon putativo estão indicados. A figura também mostra a sobreposição entre os genes *sigR* e *chrR* e o espaçamento entre CC0646 e *chrR*. B) Fragmentos de DNA obtidos a partir de análises por RT-PCR não-quantitativo resolvidos em gel de agarose 1%. Em cada análise, foi usado um par de oligonucleotídeos que hibridiza em orientação inversa nos genes CC0646 e *chrR* (F1) ou em *sigR* e *chrR* (F2). M refere-se ao marcador de tamanho molecular “1 kb plus” (Invitrogen).

A)

<i>C. crescentus</i>	MGMATGHAQSRSGSRVSAAQYDGGALITRIAQSQDRAAFAELFAHYAPRVKTLVRS	60
<i>R. sphaeroides</i>	-----MRAIRDHRDEAAFAELFQHFAPRVKGFMLKS	31
	. * . * . * . * . * . * . * . * . *	
<i>C. crescentus</i>	GSTPSAAEELAQEVMLAVWRKAHYFDPKRASAAWIFTIARNLRIDSLRRGSSALYAVDL	120
<i>R. sphaeroides</i>	GSTESQAEECAQDVMTVWQKAHLFDPSRASAATWIFTIARNRRIDGLRK-SRQPEPEDL	90
	*** * * * * . * * . * * . * * . * * . * * . * * . * * . * * . *	
<i>C. crescentus</i>	NLGAEPPQPDAILSGMQDAQIVRSAMQTLNPDQSQAIEMAFFQEQTHSQISEALGVPLG	180
<i>R. sphaeroides</i>	FWGPDAEPDQADVEMQQENDRLGRAIALLEAQRALIERAFFGDLTHRELAVETGLPLG	150
	* . . * * . . . * * * * . * * . . . * . * * *	
<i>C. crescentus</i>	TVKARIRFGMMKLRAFIEREAGVAS	205
<i>R. sphaeroides</i>	TIKSRIRLALERLRQHMS-----	168
	* . * . * * * * . . .	

B)

<i>C. crescentus</i>	MSLRRLPSEERLLAYAAGTLPPEAVVATHLALRPETRVWSDLGQAVGGGVLEDELEPSA	60
<i>R. sphaeroides</i>	MTIRHHVSDALLTAYAAGTLEAFSLVVATHLSLDCDECRAAGALDAVGSLMEETAPVA	60
	* . . * . * * * * * * . . . * * * . * * . . . * * * . * *	
<i>C. crescentus</i>	LDAGALDKTLALLD-QPEPQEPTVRLDKTDPTLPAPLRGFEFGPWRWLGPGVRVRDVLGP	119
<i>R. sphaeroides</i>	LSEGLASVMAQLDRQIQRPAPARRADPRAPPLADYVGRRLDVRWRTLGGGVRQAILP	120
	* . * . * . . * * * . * . * * * . * * * . * * * * * . *	
<i>C. crescentus</i>	RDGDCRVILLKIAPGSTPLHGGVELTCVIEGAYATESGVFEEGDFEEADPSVLHQPR	179
<i>R. sphaeroides</i>	TGGEAIARLLWIPGGQAVPDHGRGLETLVLQGAFRDETDRFGAGDIEIADQELEHTPV	180
	. * . . . * * * . * * . * * * * * . * . . * * * * * . * *	
<i>C. crescentus</i>	VVSSKPCLCVAALDGQIQLPGRMGKLLAPFVKL	212
<i>R. sphaeroides</i>	AERGLDCICLAATDAPLRFNSFLPKLVQPFRI	213
	. . . * . * . * * * * . * * . . .	

Figura 4. Comparação entre as seqüências protéicas inferidas a partir dos genes *sigR* e *chrR* de *C. crescentus* e seus homólogos *rpoE* e *chrR* em *R. sphaeroides*. Os alinhamentos entre os fatores sigma ECF σ^R e σ^E (A) e entre as proteínas ChrR (B) dessas bactérias foram gerados usando CLUSTALW (Higgins *et al.*, 1996). As posições correspondentes aos aminoácidos idênticos ou conservados são mostradas com asterisco ou ponto, respectivamente.

A fim de obter evidência adicional da possível organização dos genes *sigR*, *chrR* e CC0646 em uma mesma unidade de transcrição, análises não-quantitativas de RT-PCR foram realizadas usando conjuntos de oligonucleotídeos que se hibridizam em *sigR* e *chrR* ou em CC0646 e *chrR*. Assim, fragmentos de tamanhos esperados foram obtidos em ambos os casos (Fig. 3B), sugerindo que mRNAs correspondendo às regiões codificadoras dos genes *sigR* e *chrR* ou CC0646 e *chrR* estão presentes na linhagem parental NA1000 de *C. crescentus* e reforçando a idéia da existência de uma unidade de transcrição envolvendo esses genes.

4.1.2. O gene *sigR* regula positivamente sua própria expressão

Para investigar se *sigR* regula sua própria expressão durante o crescimento normal de *C. crescentus*, uma linhagem mutante nulo, denominada SG200, foi construída através da substituição da cópia original de *sigR* por uma cópia truncada contendo uma deleção interna que mantém o quadro de leitura da proteína σ^R (Fig. 5A). Conforme inferido através de ensaios enzimáticos de β -galactosidase realizados a partir de células contendo uma fusão de transcrição entre a região imediatamente a montante de *sigR* e o gene repórter *lacZ* (construção pRSR), a atividade promotora de *sigR* não foi afetada com a deleção da maior parte da região codificadora desse gene (Fig. 5B), sugerindo que σ^R não participa do controle do próprio gene que o codifica durante o crescimento normal de *C. crescentus*. Uma vez que a atividade da enzima β -galactosidase detectada em células da linhagem SG200 contendo a construção pRSR (~1.000 unidades) é bastante superior àquela obtida a partir de células da mesma linhagem contendo apenas o plasmídeo vazio (sem promotor exógeno a montante do gene *lacZ*) (~150 unidades), pelo menos um promotor independente de σ^R está envolvido no controle da expressão de *sigR* durante essa condição de crescimento da bactéria. Por outro lado, a superexpressão de *sigR* na linhagem parental NA1000 através de cópias extras desse gene sob o

controle de um promotor constitutivo (P_{lacZ}) (construção pRL280), resultou num drástico aumento (~11 vezes) da atividade promotora de *sigR* (Fig. 5B), indicando que σ^R é capaz de regular positivamente a expressão do próprio gene que o codifica quando presente em níveis elevados na célula. Para assegurar que esse aumento na atividade promotora de *sigR* não seja resultado de um efeito inespecífico causado pelos altos níveis de um fator sigma na célula, dois outros genes que codificam fatores sigma ECF em *C. crescentus*, *sigE* e *sigT*, foram superexpressos individualmente a partir do promotor P_{lacZ} (construções pRL180 e pRL480, respectivamente), e, como esperado, nenhuma alteração na atividade promotora de *sigR* foi observada em ambos os casos (dados não mostrados). Adicionalmente, esse resultado indica que a expressão basal de *sigR* não depende dos fatores σ^E e σ^T .

Figura 5. Efeito de *sigR* sobre sua própria expressão durante condições normais de crescimento. A) Fragmentos de DNA resultantes de amplificações por PCR resolvidos em gel de agarose 1%. Os produtos de amplificação correspondem a um segmento abrangendo a região codificadora de *sigR* de diferentes colônias que passaram pelos dois eventos de recombinação usados para a obtenção da linhagem SG200 ($\Delta sigR$). B) Atividade promotora de *sigR* determinada através de ensaios de atividade de β -galactosidase em células portando a construção pRSR. Os sinais (-), (+) e (++) correspondem aos seguintes níveis de expressão de *sigR*: ausente (linhagem SG200), basal (linhagem NA1000) e aumentado (linhagem NA1000 portando a construção pRL280). Os resultados correspondem à média de três experimentos independentes com os respectivos erros-padrões.

A superexpressão de *sigR* em células da linhagem parental NA1000 de *C. crescentus* também resultou na diminuição da taxa de crescimento da cultura, sugerindo que altos níveis de σ^R são prejudiciais

para células crescendo sob condições normais. Por outro lado, nenhum efeito drástico sobre o crescimento foi observado com a superexpressão de *sigU* ou *sigE* (Fig. 6).

Figura 6. Expressão aumentada de *sigR* é prejudicial para o crescimento de *C. crescentus* sob condições normais. A) Curvas de crescimento em meio PYE líquido. B) Análise não-quantitativa de viabilidade celular, mostrando o crescimento das diferentes culturas em meio PYE sólido 3 dias após o plaqueamento. Em ambas as análises, foram comparadas culturas da linhagem NA1000 contendo o vetor pJS14 vazio e culturas da mesma linhagem superexpressando *sigR*, *sigU* ou *sigE* através das construções pRL280, pCM7 e pRL180, respectivamente. Os números 1, 2, 3, 4 e 5 correspondem às diluições de 1, 10, 100, 1000 e 10.000x, respectivamente, a partir das culturas originais em fase exponencial de crescimento que foram usadas no plaqueamento.

4.1.3. *chrR* regula negativamente a expressão de *sigR*

Os resultados mostrados acima sugerem que durante condições normais de crescimento *sigR* é expresso na célula, mas não é capaz de regular positivamente sua própria expressão. Isso seria explicado se σ^R fosse mantido num estado inativo durante tais condições, possivelmente devido à ação do produto de *chrR*. A fim de verificar se *chrR* exerce algum papel sobre a expressão de *sigR*, procurou-se obter uma linhagem mutante no gene que codifica esse potencial fator anti-sigma. Para isso, uma cópia de *chrR* contendo uma deleção interna que mantém o quadro de leitura de *ChrR* foi construída e usada para substituir sua equivalente selvagem no genoma da linhagem parental NA1000. No entanto, todas as 66 colônias isoladas após dois dias de crescimento em meio seletivo para o segundo evento de recombinação haviam perdido a cópia truncada do gene *chrR*, revertendo

para o genótipo selvagem. Isso sugere que a inativação de *chrR* interfere com a fisiologia da célula mesmo em condições normais de crescimento, de modo semelhante à superexpressão de σ^R . Para confirmar tal hipótese, o segundo evento de recombinação foi realizado a partir de células contendo uma cópia funcional de *chrR* codificada por um plasmídeo e sob controle de um promotor dependente de xilose (P_{xylX}) (construção pRL390). A proteína expressa a partir dessa cópia plasmidial de *chrR* possui uma extensão N-terminal de 151 aminoácidos codificada pelo plasmídeo que não é encontrada na proteína expressa a partir da cópia cromossômica do gene. Usando essa estratégia, foram obtidas colônias que haviam perdido a cópia original de *chrR* após o segundo evento de recombinação, dando origem a uma linhagem mutante condicional em *chrR* denominada SG250 (Fig. 7A). Tais colônias foram obtidas crescendo as células tanto na presença de xilose como na presença de glicose, sugerindo que a expressão de *chrR* a partir da cópia plasmidial pode ocorrer mesmo na ausência de xilose no meio. Interessantemente, conforme revelado por análises quantitativas de RT-PCR, a expressão de *chrR* na linhagem SG250 (decorrente das várias cópias plasmidiais do gene) é cerca de 600 vezes superior àquela observada na linhagem parental NA1000 contendo apenas o plasmídeo vazio pUJ142 (decorrente da cópia cromossômica única do gene), quando ambas são crescidas na presença de glicose. A expressão de *chrR* na linhagem SG250 aumenta ainda mais (~2 vezes) quando xilose é usada durante o crescimento da cultura, ao passo que na linhagem parental NA1000 a expressão desse gene não é alterada com a presença de xilose no meio.

Conforme determinado através de ensaios enzimáticos de β -galactosidase usando células contendo a construção pRSR, a atividade promotora de *sigR* na linhagem SG250 é superior àquela observada na linhagem parental NA1000, quando ambas são cultivadas na presença de glicose (Fig. 7B). Contudo a presença de xilose no meio crescimento resulta numa menor diferença da atividade promotora de *sigR* entre as linhagens SG250 e NA1000 (Fig. 7B). Como esperado, a atividade promotora de *sigR* na

linhagem NA1000 não foi alterada com a natureza do açúcar presente no meio (Fig. 7B), indicando que a diminuição da atividade desta região observada na linhagem SG250 quando xilose estava presente no meio ocorreu como consequência do aumento da expressão de *chrR* nas células e não como um efeito negativo da xilose sobre a expressão desse gene. Juntos, esses resultados sugerem que *chrR* regula negativamente a expressão de *sigR* e que a proteína codificada a partir da cópia plasmidial de *chrR* não é totalmente funcional, de modo que, mesmo em altos níveis na célula, não é suficiente para manter reduzida a atividade promotora de *sigR* na linhagem SG250.

Para obter evidência adicional de que a expressão de *chrR* em células da linhagem parental NA1000 crescendo sob condições normais é suficiente para manter a expressão de *sigR* em níveis basais, *chrR* foi superexpresso através do promotor constitutivo P_{lacZ} (construção pRL380). Ensaios enzimáticos de β -galactosidase mostraram que nenhuma diminuição da atividade promotora de *sigR* ocorre como consequência da expressão aumentada de *chrR* nas células (Fig. 7B).

Figura 7. Efeito de *chrR* sobre a expressão de *sigR*. A) Fragmentos de DNA resultantes de amplificações por PCR resolvidos em gel de agarose 1%. Os produtos de amplificação correspondem a um segmento abrangendo a região codificadora de *chrR* de diferentes colônias portando a construção pRL390 que passaram pelos dois eventos de recombinação usados para a obtenção da linhagem SG250 (Δ *chrR*/pRL390). B) Atividade promotora de *sigR* determinada por meio de ensaios de atividade de β -galactosidase em células portando a construção pRSR. Células do mutante condicional SG250 e da linhagem parental superexpressando (NA1000/pRL380) ou não (NA1000/pUJ142) *chrR* foram cultivadas na presença de D-glicose 0,2% (gli) ou D-xilose 0,2% (xil) por 4 h após a lavagem das células como descrito em Materiais e Métodos. Os resultados correspondem à média de três experimentos independentes com os respectivos erros-padrões.

4.1.4. Mutantes nulos em *chrR* carregam mutações secundárias em *sigR*

Conforme mencionado acima, a obtenção de colônias mutantes em *chrR* após dois dias de crescimento em meio seletivo para o segundo evento de recombinação somente foi possível quando as células bacterianas carregavam simultaneamente uma cópia plasmidial do gene. Contudo, em placas de seleção incubadas por longos períodos (até 10 dias), algumas colônias tornaram-se evidentes após cinco dias de crescimento. Três dessas colônias haviam perdido a cópia original de *chrR*, originando uma linhagem mutante nulo em *chrR* denominada SG251, enquanto as demais ainda retinham as cópias truncada e original de *chrR* no genoma juntamente com o vetor pNPTS138 (Fig. 8A). A resistência a sacarose observada nas últimas colônias pode ser consequência da inativação do gene *sacB* presente no vetor. Como essas colônias mutantes não mostraram diferenças na taxa de crescimento quando comparadas com a linhagem parental NA1000 em análises posteriores (dados não-mostrados), a possível ocorrência de mutações secundárias nesses mutantes nulos em *chrR* foi assumida como responsável por esse crescimento normal. Conforme mencionado anteriormente, a disfunção de ChrR em *C. crescentus* resulta na expressão aumentada de *sigR* e a superexpressão deste gene é prejudicial para o crescimento da bactéria. Portanto, ao inativar *chrR*, a expressão do gene *sigR* aumenta na célula, e o crescimento da bactéria é provavelmente prejudicado. No entanto, mutantes nulos em *chrR* poderiam crescer normalmente se mutações secundárias afetassem a expressão de *sigR* na bactéria. Para investigar se esse foi o caso nas colônias da linhagem SG251, a atividade promotora de *sigR* nesses mutantes nulos em *chrR* foi analisada através de ensaios enzimáticos de β -galactosidase usando a construção pRSR. De acordo com a atividade promotora de *sigR*, dois tipos de mutantes nulos foram encontrados (Fig. 8B). Em um deles, denominado SG251-1, a região promotora de *sigR* possui uma atividade duas vezes superior àquela observada na linhagem parental NA1000. Nas outras duas colônias, referidas como SG251-2a e SG251-2b, nenhuma alteração na atividade

dessa região foi observada em relação à linhagem NA1000. Comparando com a linhagem SG250, na qual ChrR não é totalmente inativado, fica evidente que a expressão de *sigR* foi afetada em todas as três colônias da linhagem SG251, que não possuem ChrR funcional (Fig. 7B e 8B).

NA1000	MGM	YAT	GHA	QSR	SRG	SRV	SAA	QYD	GGA	LIT	RIA	QSQ	DRA	AFA	ELF	FAH	YAP	RVK	TLL	VRS	60
SG251-1	MGM	YAT	GHA	QSR	SRG	SRV	SAA	QYD	GGA	LIT	RIA	QSQ	DRA	AFA	ELF	FAH	YAP	RVK	TLL	VRS	60
SG251-2a	MGM	YAT	GHA	QSR	SRG	SRV	SAA	QYD	GGA	LIT	RIA	QSQ	DRA	AFA	ELF	FAH	YAP	RVK	TLL	VRS	60

NA1000	GST	PSA	AEEL	AQE	VML	AVR	KAH	YFD	PKR	ASAA	AWIFT	IA	RNL	RID	SLR	RGSS	ALY	AVDL	120		
SG251-1	SST	PSA	AEEL	AQE	VML	AVR	KAH	YFD	PKR	ASAA	AWIFT	IA	RNL	RID	SLR	RGSS	ALY	AVDL	120		
SG251-2a	GST	PSA	AEEL	AQE	VML	AVR	KAH	YFD	PKR	ASAA	AWIFT	IA	RNL	RID	SLR	RGSS	ALY	AVDL	120		

NA1000	NLGA	EPP	QPD	AIL	SGM	QDA	QIV	RSAM	QTL	NPD	QSQ	AIEMA	FFQE	QTH	SQI	SEAL	GVPL	G	180		
SG251-1	NLGA	EPP	QPD	AIL	SGM	QDA	QIV	RSAM	QTL	NPD	QSQ	AIEMA	FFQE	QTH	SQI	SEAL	GVPL	G	180		
SG251-2a	NLGA	EPP	ATRR	HSQ	RHAG	RPD	RPLR	HAN	PQSR	SIP	SNR	NGLL	PGT	DPQ	SDFR	GAG	RAP	G	180		

NA1000	TVK	ARIR	FGMM	KLRA	FI	ERE	AG	V	S										205		
SG251-1	TVK	ARIR	FGMM	KLRA	FI	ERE	AG	V	S										205		
SG251-2a	YQG	SDPL	WHDE	AAR	LYR	ARG	SRV	VS	LRRL	PSE	ERLL	AYA	AGT	LS	PPE	AVV	VATH	LLER	240		
NA1000																					
SG251-1																					
SG251-2a	VVSS	KPCL	CVA	ALD	GQI	QLP	GRM	GKLL	APF	VKL	273										

(Legenda na próxima página)

Uma vez que σ^R é capaz de regular a expressão do próprio gene que o codifica, as mutações secundárias presentes nas colônias da linhagem SG251 poderiam ter ocorrido no gene *sigR* ou em sua região promotora. Para investigar essas possibilidades, a região codificadora de *sigR* juntamente com os 171 pb localizados a montante desse gene de cada mutante nulo em *chrR* foram amplificados por

PCR e seqüenciados, e as seqüências obtidas foram comparadas com a região correspondente da linhagem parental NA1000. Essa análise revelou uma única substituição de nucleotídeo (G181A) ocorrida no gene *sigR* do mutante SG251-1, onde a atividade promotora deste gene aumentou duas vezes em relação à linhagem NA1000. Essa mutação espontânea resultou numa substituição não-conservativa Gly61Ser, indicando que o resíduo de glicina nessa posição é importante para a função de σ^R (Fig. 8C). Por outro lado, os mutantes nulos onde a atividade promotora de *sigR* é similar àquela observada na linhagem NA1000 (SG251-2a e SG251-2b) carregam a inserção de 1 nucleotídeo após a posição 383 do gene *sigR*. A alteração do quadro de leitura resultante dessa inserção provavelmente causa inativação de σ^R , já que somente os primeiros 128 resíduos de aminoácidos não foram modificados. Além disso, a forma mutante de σ^R contém 68 resíduos extras de aminoácidos, uma vez que o códon de parada mais próximo do início de *sigR* está localizado 204 nucleotídeos a jusante do códon de parada do gene *sigR* presente na linhagem NA1000 (Fig. 8C). É mais parcimonioso assumir que as duas colônias contendo tal inserção originaram de uma mesma célula onde essa mutação espontânea ocorreu do que aceitar a existência da mesma inserção por dois eventos independentes. Portanto, esses resultados mostram que a obtenção de um mutante nulo em *chrR* é possível somente se o gene *sigR* for concomitantemente alterado.

Figura 8. Mutantes nulos em *chrR* carregam mutações espontâneas no gene *sigR*. A) Fragmentos de DNA resultantes de amplificações por PCR resolvidos em gel de agarose 1%. Os produtos de amplificação correspondem a um segmento abrangendo a região codificadora de *chrR* de diferentes colônias que passaram pelos dois eventos de recombinação usados para a obtenção das linhagens SG251-1, SG251-2a e SG251-2b ($\Delta chrR$). B) Ensaio de atividade de β -galactosidase realizados a partir de células da linhagem parental NA1000 e dos mutantes nulos em *chrR* (SG251-1, SG251-2a e SG251-2b) contendo a construção pRSR. Os resultados referem-se à média de três experimentos independentes, com os respectivos erros-padrões. C) Alinhamento entre as seqüências de σ^R da linhagem parental NA1000 e dos mutantes nulos em *chrR* (SG251-1 e SG251-2a), gerado por CLUSTALW (Higgins *et al.*, 1996). Essas seqüências protéicas foram inferidas a partir das seqüências nucleotídicas de *sigR* obtidas por sequenciamento automático. A partir do aminoácido 129, σ^R da cepa SG251-2a (mostrada em cinza) não se alinha com σ^R das linhagens NA1000 e SG251-1 devido à mudança no quadro de leitura causada pela inserção C384 no gene *sigR* da cepa SG251-2a. As posições correspondentes aos aminoácidos idênticos ou conservados são mostradas com asterisco ou ponto, respectivamente.

4.1.5. A expressão de *sigR* é induzida por cádmio, hidroperóxido orgânico e oxigênio singlete

Para verificar se *sigR* estaria de fato envolvido na resposta de *C. crescentus* ao estresse causado por cádmio conforme sugerido anteriormente, o efeito desse metal pesado sobre a atividade promotora de *sigR* foi analisado em células da linhagem parental NA1000 portando a construção pRSR. Ensaio enzimáticos de β -galactosidase mostraram que a atividade promotora de *sigR* é significativamente induzida quando células dessa linhagem bacteriana são expostas ao CdSO_4 , sendo a máxima indução observada na presença de 25 μM desse metal pesado (Fig. 9A). Concentrações de CdSO_4 superiores a 50 μM não resultam em expressão aumentada de *sigR*, provavelmente devido ao efeito citotóxico desse metal. Ao contrário do cádmio, nenhum efeito sobre a atividade promotora desse gene foi observado durante o tratamento de culturas de *C. crescentus* com várias concentrações de outros metais como ferro, cobre, cobalto, níquel e zinco (dados não mostrados).

A fim de investigar se a expressão de *sigR* também é induzida na presença de $^1\text{O}_2$, de modo semelhante ao observado para seu ortólogo *rpoE* na bactéria *R. sphaeroides*, células da linhagem parental NA1000 foram tratadas com o sensibilizador azul de metileno (AM) na presença de luz branca. Conforme revelado por ensaios enzimáticos de β -galactosidase, a atividade promotora de *sigR* também é induzida durante essa condição de modo dependente da concentração de AM (Fig. 9B). Usando uma mesma intensidade de luz branca (6 W/m^2), a máxima indução da atividade promotora de *sigR* foi notada com AM na concentração final de 2,5 μM . Concentrações maiores desse sensibilizador resultaram em menores intensidades de indução. Uma vez que $^1\text{O}_2$ é gerado a partir de AM somente na presença de luz, nenhuma indução da atividade promotora de *sigR* ocorreu quando culturas contendo esse sensibilizador foram mantidas no escuro (Fig. 9C). Adicionalmente, a exposição de células de *C. crescentus* à luz branca na ausência de AM resultou apenas num ligeiro aumento da atividade promotora desse gene (Fig. 9C).

Figura 9. A expressão de *sigR* é induzida por cádmio, tBOOH e ¹O₂. Atividade promotora de *sigR* determinada por meio de ensaios de atividade de β-galactosidase em células portando a construção pRSR. Culturas da linhagem parental NA1000 em fase exponencial de crescimento, submetidas aos seguintes estresses: A) CdSO₄ por 1 h. B) AM na presença de luz branca (6 W/m²) por 2 h. C) AM 2, 5 μM e/ou luz branca (6 W/m²) por 2 h. D) tBOOH por 30 min.

Além de ¹O₂, a fotossensibilização de baixas concentrações de AM pode gerar, em pequenas proporções, outras EROs como O₂^{•-} e H₂O₂. Para investigar se o efeito da fotossensibilização de AM sobre a atividade promotora de *sigR* pode ser mediado por O₂^{•-} e H₂O₂, células de *C. crescentus* foram expostas à luz branca na presença de várias concentrações de riboflavina. Ao contrário do AM, a riboflavina participa preferencialmente de reações de transferência de elétrons (mecanismo tipo I), contribuindo para a geração de grandes quantidades de O₂^{•-} e H₂O₂ e pouco ¹O₂. Contudo, a atividade

promotora de *sigR* não foi afetada pela fotossensibilização desse composto (dados não mostrados), sugerindo que $O_2^{\bullet -}$ e H_2O_2 não são capazes de induzir a expressão de *sigR*. De fato, nenhuma alteração na atividade desse gene foi observada após o tratamento celular com diferentes concentrações de paraquat (gerador de $O_2^{\bullet -}$) ou H_2O_2 . Portanto, esses resultados sugerem que 1O_2 é o responsável pela indução da atividade promotora de *sigR* durante a fotossensibilização de AM em culturas de *C. crescentus*.

Adicionalmente ao cádmio e ao 1O_2 , *tert*-butil hidroperóxido (tBOOH) também é capaz de induzir a expressão de *sigR* quando presente nas células de *C. crescentus*. A adição de tBOOH na concentração final de 100 μM à cultura de células da linhagem NA1000 resulta na máxima indução da atividade promotora de *sigR*. Acima dessa concentração, intensidades menores de indução são observadas (Fig. 9D).

Uma vez que cádmio, 1O_2 e tBOOH são capazes de oxidar grupos tióis, o efeito de diamida, um oxidante específico desses grupos, sobre a expressão de *sigR* também foi investigado. Contudo, nenhuma alteração da atividade promotora de *sigR* foi observada durante o tratamento de células da linhagem NA1000 com diferentes concentrações de diamida (dados não mostrados).

A atividade máxima da enzima β -galactosidase em células expostas ao tBOOH 100 μM foi detectada 30 min após a adição do indutor (Fig. 10A). Exposições mais prolongadas ao tBOOH não resultaram em aumento adicional da atividade de β -galactosidase, ao passo que atividades ainda maiores dessa enzima foram observadas ao expor as células durante períodos mais longos ao $CdSO_4$ 25 μM (pico de atividade ao redor de 2h) ou ao AM 2,5 μM na presença de luz branca (a atividade de β -galactosidase aumentou até o último ponto analisado- 4 h) (Fig. 10A).

Embora nenhuma alteração significativa da atividade promotora de *sigR* tenha sido observada em células da linhagem mutante SG200 crescendo sob condições normais, a indução da atividade

promotora desse gene na presença de cádmio, tBOOH e $^1\text{O}_2$ foi perdida com a deleção de *sigR* (Fig. 10B), indicando que esse gene é capaz de regular positivamente sua própria expressão durante tais condições de estresse. Uma vez que ChrR age como um regulador negativo da expressão de *sigR*, tais resultados obtidos com células da linhagem SG200 também sugerem que esse fator anti-sigma putativo de σ^R é inativado durante a exposição de células de *C. crescentus* ao cádmio, tBOOH e $^1\text{O}_2$. Adicionalmente, a superexpressão de *chrR* a partir da construção pRL380 em células da linhagem NA1000 também suprime o efeito dessas condições de estresse sobre a atividade promotora de *sigR* (Fig. 10B), provavelmente porque as concentrações de cádmio, tBOOH e AM usadas não são suficientes para inativar as moléculas de ChrR que estão em excesso em relação ao fator σ^R .

Figura 10. O gene *sigR* é auto-regulado positivamente na presença de cádmio, tBOOH e $^1\text{O}_2$. Atividade promotora de *sigR* determinada por meio de ensaios de atividade de β -galactosidase em células portando a construção pRSR. A) Culturas da linhagem parental NA1000 em fase exponencial de crescimento tratadas ou não com CdSO_4 25 μM , tBOOH 100 μM ou AM 2.5 μM na presença de luz branca (6 W/m^2). B) Células da linhagem SG200 (ΔsigR) e NA1000 portando ou não a construção pRL380 expostas às condições descritas acima por 1 h. Os resultados correspondem à média de três experimentos independentes com os respectivos erros-padrões.

4.1.6. Os níveis da proteína σ^R aumentam em células expostas ao cádmio, tBOOH, 1O_2 e à radiação UVA

A fim de investigar se a indução da atividade promotora de *sigR* na presença de cádmio, tBOOH e 1O_2 reflete em aumento dos níveis de σ^R e determinar a cinética de acúmulo dessa proteína nas células, um anticorpo policlonal foi obtido em coelho contra a proteína recombinante His₆- σ^R (σ^R fusionada em sua porção N-terminal a uma sequência contendo seis resíduos de histidina) expressa em *E. coli*. Usando esse anticorpo, análises por Western blot mostraram a presença de uma banda que é facilmente detectada em extratos protéicos de células expressando *sigR* em altos níveis (células mutante condicional em *chrR* crescidas na presença de glicose ou células da linhagem parental NA1000 contendo a construção pRL280) (dados não mostrados). Essa banda também pode ser observada em extratos protéicos da linhagem NA1000, mas não naqueles provenientes da linhagem mutante em *sigR* (SG200), quando as membranas contendo tais extratos são incubadas por longos períodos com os substratos da enzima fosfatase alcalina (dados não mostrados).

Análises similares de Western blot revelaram que os níveis de σ^R aumentam transitoriamente quando células da linhagem NA1000 são tratadas com CdSO₄ 25 μ M (Fig. 11A) ou tBOOH 100 μ M (Fig. 11B). Níveis aumentados de σ^R também são evidentes após a exposição de células dessa linhagem ao AM 2,5 μ M na presença de luz branca (6 W/m²) (Fig. 11C). Os níveis de σ^R detectados sob tal condição de estresse permanecem elevados nas células enquanto a incidência de luz sobre as culturas contendo AM for mantida, já que 1O_2 é constantemente gerado durante essa condição. Uma vez que a meia-vida desta ERO em sistemas biológicos é inferior a 3 μ s, a transferência de uma cultura previamente exposta à luz na presença de AM consiste numa maneira de interromper imediatamente o estresse. Dessa forma, uma diminuição gradual dos níveis de σ^R foi observada ao remover a fonte de

luz originalmente usada para a geração de $^1\text{O}_2$ em culturas de células da linhagem NA1000 (Fig. 11C).

Figura 11. Os níveis de σ^R aumentam em *C. crescentus* durante os estresses induzidos por cádmio, tBOOH e $^1\text{O}_2$ e radiação UVA. Os resultados mostrados referem-se às análises por Western blot realizadas a partir de extratos protéicos totais de células da linhagem NA1000 expostas às seguintes condições de estresse: A) CdSO₄ 25 μM . B) tBOOH 100 μM . C) AM 2.5 μM na presença de luz branca (6 W/m²) durante 2,5 h ou por 30 min seguido da transferência da cultura para um ambiente escuro. D) radiação UVA (pico de emissão em 365 nm) com dose equivalente a 80kJ/m² (78W/m² por 17 min) e então transferida para um ambiente escuro. Aliquotas para a preparação dos extratos foram retiradas antes, durante e após a remoção das fontes de luz, quando usadas. Membranas contendo as proteínas dos extratos separadas eletroforicamente foram incubadas com o anticorpo anti- σ^R e anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina. A banda correspondente ao fator σ^R está indicada na figura. Abaixo de σ^R é mostrada um banda reconhecida inespecificamente pelo anticorpo anti- σ^R , conforme revelado pelo extrato protéico da linhagem mutante em *sigR* (SG200).

Comparando as variações dos níveis de σ^R ao longo das diferentes condições de estresse, observa-se que o aumento dos níveis dessa proteína na presença de tBOOH e 1O_2 ocorre mais rapidamente do que quando as células são expostas ao cádmio. Além disso, os níveis de σ^R diminuem mais lentamente em células que foram expostas ao 1O_2 quando comparado com células tratadas com cádmio ou tBOOH (Fig. 11).

Os resultados mostrados acima sugerem que a exposição ao cádmio consiste numa condição ambiental provavelmente encontrada por *C. crescentus* em seu habitat natural que resulta no aumento da expressão de *sigR*. Similarmente, condições ambientais que resultem na geração de quantidades suficientes de 1O_2 e/ou ROOH também poderiam induzir a expressão desse gene. Sabe-se que a irradiação de células com luz visível ou UVA é conhecida por aumentar a geração de EROs através da ação de sensibilizadores endógenos (Wondrak *et al.*, 2006). Contudo, a exposição de células de *C. crescentus* à luz branca (6 W/m²) parece gerar somente pequenas quantidades de 1O_2 e/ou ROOH, já que apenas uma ligeira indução da expressão de *sigR* foi observada, conforme inferido na seção anterior através de ensaios enzimáticos de β -galactosidase. Por outro lado, quando o efeito da radiação UVA sobre a expressão desse gene foi investigado, observou-se que os níveis de σ^R aumentam durante tal condição de estresse, mesmo na ausência de um sensibilizador exógeno como o AM (Fig. 11D). Ao remover a fonte de radiação UVA, os níveis dessa proteína diminuem de maneira similar ao observado após a transferência de uma cultura previamente exposta à luz branca e AM para o escuro (Fig. 11D). Portanto, esse resultado sugere que σ^R também exerce um papel na resposta de *C. crescentus* à radiação UVA.

4.1.7. Zinco suprime o efeito de cádmio sobre a expressão de *sigR*

Tem sido demonstrado em sistemas biológicos distintos que o aumento da expressão de alguns genes durante a exposição celular ao cádmio não ocorre quando as células são pré-tratadas com zinco (Bertin and Auerbeck, 2006). A fim de verificar se este metal tem algum papel na indução da expressão de *sigR* por cádmio, células da linhagem NA1000 foram pré-tratadas com ZnSO₄ em concentrações finais variando de 25 a 250 µM por 2h antes da adição de CdSO₄ 25 µM. Análises por Western blot usando o anticorpo anti-σ^R revelaram que o aumento do nível de σ^R causado pela exposição celular ao cádmio ainda ocorre quando as células são pré-tratadas com ZnSO₄ 25 µM, mas concentrações maiores deste metal resultam em induções progressivamente menores, desaparecendo a resposta ao cádmio quando ZnSO₄ 250 µM foi usado no pré-tratamento (Fig. 12A). O efeito do zinco sobre a indução mediada por cádmio também foi analisado em células da linhagem NA1000 exposta simultaneamente aos metais zinco e cádmio. Análises semelhantes por Western blot mostraram que o aumento do nível de σ^R durante a exposição a cádmio é totalmente inibido mesmo em concentrações de zinco tão baixas quanto 25 µM (Fig. 12B). Juntos, esses resultados mostram que zinco é capaz de suprimir o efeito de cádmio sobre a expressão de *sigR*.

(Legenda na próxima página)

4.1.8. Os resíduos C186 e C188 de ChrR são necessários para a percepção de cádmio, mas não de $^1\text{O}_2$ e tBOOH

Tem sido demonstrado que resíduos de cisteína em diversos reguladores transcricionais e fatores sigma estão envolvidos na percepção do estado oxidativo das células (Fuangthong *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004; Paget *et al.*, 2001a). A proteína ChrR de *C. crescentus* possui quatro resíduos de cisteína, sendo que dois desses (posições 186 e 188) são amplamente conservados nos ortólogos dessa proteína em diferentes bactérias, incluindo *R. sphaeroides* (apêndice). Para investigar se os resíduos conservados C186 e C188 de ChrR são necessários para a percepção de cádmio, $^1\text{O}_2$ e/ou tBOOH em *C. crescentus*, mutagênese sítio-dirigida foi empregada para substituir individualmente cada um desses resíduos por serina. Uma vez que a alteração no códon correspondente ao resíduo C188 resulta num sítio extra de reconhecimento para a enzima DdeI, o padrão de restrição do gene *chrR* contendo esse códon alterado é diferente daquele observado para esse mesmo gene na linhagem parental NA1000. Essa diferença foi então usada para selecionar uma linhagem de *C. crescentus*, denominada SG253, que expressa ChrR/C188S ao invés da forma original da proteína (Fig. 13A). Por outro lado, a alteração no códon que especifica o resíduo C186 não causa modificação do perfil de restrição do gene *chrR*. Desse modo, a cópia contendo essa alteração foi usada para substituir sua equivalente na linhagem SG253, dando origem a uma linhagem expressando apenas ChrR/C186S, denominada SG252 (Fig. 13B).

Figura 12. Zinco suprime o efeito do cádmio sobre a expressão de *sigR*. São mostrados resultados de Western blot realizados a partir de extratos protéicos totais de células da linhagem NA1000. A) Culturas de células foram pré-tratadas com diferentes concentrações de ZnSO_4 (0-250 μM) 2 h antes da adição de CdSO_4 25 μM . Alíquotas foram retiradas 1 h após a adição do cádmio. B) Alíquotas para preparação dos extratos protéicos foram obtidas 1 h após a adição concomitante de CdSO_4 25 μM e ZnSO_4 (0-250 μM) à cultura. Em ambos os experimentos, uma parte da cultura de células foi mantida sob condições normais de crescimento (sem a adição de CdSO_4 e ZnSO_4) para controle da indução de σ^R por cádmio. Membranas contendo as proteínas dos extratos separadas eletroforéticamente foram incubadas com o anticorpo anti- σ^R e anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina. A banda correspondente ao fator σ^R está indicada na figura. Abaixo de σ^R é mostrada uma banda reconhecida inespecificamente pelo anticorpo anti- σ^R , conforme revelado pelo extrato protéico da linhagem mutante em *sigR* (SG200).

Figura 13. Obtenção de linhagens que expressam ChrR/C186S (SG252), ChrR/C188S (SG253) ou ChrR/C186-188S (SG254) em lugar da equivalente selvagem ChrR. Os resultados referem-se aos produtos de restrição de fragmentos de DNA abrangendo a região codificadora de *chrR* obtidos com a enzima DdeI em gel de agarose 1%. Esses fragmentos foram obtidos a partir de reações de amplificação por PCR usando como molde o DNA genômico de diferentes colônias que passaram pelos dois eventos de recombinação usados para a obtenção das linhagens SG253 (A), SG252 (B) e SG254 (C).

Análises por Western blot usando o anticorpo anti- σ^R mostraram que as proteínas mutantes ChrR/C186S e ChrR/C188S são ainda capazes de regular negativamente a expressão de *sigR*, já que nenhum aumento nos níveis de σ^R foi observado no primeiro caso (linhagem SG252) e apenas um pequeno aumento foi evidenciado no segundo caso (linhagem SG253), quando se compara com a linhagem NA1000 em condições normais de crescimento (Fig. 14). Contudo, células pertencentes a essas linhagens são incapazes de induzir a expressão de *sigR* na presença de cádmio (Fig. 14A), indicando que os resíduos C186 e C188 de ChrR são necessários para a percepção desse metal pesado na célula. Interessantemente, os níveis de σ^R ainda aumentam quando células de ambas as linhagens SG252 e SG253 são expostas ao tBOOH (Fig. 14B) ou ao $^1\text{O}_2$ (Fig. 14C), sugerindo que cádmio induz

a expressão de *sigR* em células de *C. crescentus* através de um mecanismo distinto daquele empregado por $^1\text{O}_2$ e tBOOH.

Figura 14. Papel dos resíduos C186 e C188 de ChrR na percepção de cádmio, tBOOH e $^1\text{O}_2$. Os resultados mostrados correspondem a análises por Western blot realizadas a partir de extratos protéicos totais que foram obtidos de células das linhagens NA1000 (ChrR selvagem), SG252 (ChrR/C186S), SG253 (ChrR/C188S) e SG254 (ChrR/C186-188S) antes (-) e durante (+) as seguintes condições de estresse: A) CdSO_4 25 μM por 60 min. B) tBOOH 100 μM por 20 min. C) AM 2.5 μM na presença de luz branca (6 W/m^2) por 30 min. Membranas contendo as proteínas dos extratos separadas eletroforéticamente foram incubadas com o anticorpo anti- σ^R e anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina. A banda correspondente ao fator σ^R está indicada na figura. Abaixo de σ^R é mostrada uma banda reconhecida inespecificamente pelo anticorpo anti- σ^R , conforme revelado pelo extrato protéico da linhagem mutante em *sigR* (SG200).

Adicionalmente, uma linhagem expressando apenas ChrR/C186-188S, denominada SG254, foi construída através da substituição da cópia original de *chrR* no genoma da linhagem NA1000 por uma cópia contendo ambos os códons que especificam os resíduos C186 e C188 alterados para um dos códons correspondentes a serina (Fig. 13C). Como revelado em análises por Western blot, os níveis de σ^R já estão aumentados em células dessa linhagem crescendo sob condições normais, sendo estes níveis praticamente equivalentes àqueles observados em células da linhagem mutante condicional em *chrR* (SG250) crescidas na presença de glicose (Fig. 14C). De modo similar ao observado na

linhagem SG250, os altos níveis de σ^R em células da linhagem SG254 não são suficientes para interferir com o crescimento ou viabilidade celulares (dados não mostrados).

4.1.9. Efeito *in vivo* de proteases sobre a estabilidade de σ^R

A capacidade de *C. crescentus* de induzir a expressão de *sigR* na presença de cádmio, tBOOH e $^1\text{O}_2$ permite investigar possíveis proteases envolvidas na degradação de ChrR, já que o possível acúmulo desse fator anti-sigma putativo decorrente da ausência da protease envolvida em sua degradação impediria o aumento dos níveis de σ^R durante as condições de estresse. Adicionalmente, proteases responsáveis pela degradação de σ^R também poderiam ser identificadas analisando os níveis de σ^R ao longo da exposição de *C. crescentus* ao cádmio ou ao tBOOH e após a transferência de células previamente expostas ao $^1\text{O}_2$ para o escuro, uma vez que os níveis desse fator sigma diminuem em tais condições, mas na ausência da protease específica os níveis permaneceriam elevados. Como algumas proteases de *C. crescentus* foram previamente caracterizadas, linhagens mutantes nos genes que as codificam estão disponíveis para a análise dos níveis de σ^R . Ortólogos em *C. crescentus* dos genes *yaeL* (CC1916) e *degS* (CC0151, CC0702, CC1282 e CC2758) de *E. coli*, foram identificados e codificam proteases envolvidas na degradação de proteínas localizadas na membrana interna da bactéria (Chen *et al.*, 2005). O papel desses genes sobre a estabilidade de σ^R e ChrR foi testado através de duas linhagens mutantes, LS3706 ($\Delta mmpA$) e LS4049 (cepa contendo mutações nos quatro genes ortólogos de *degS* de *E. coli*). Contudo, os níveis de σ^R ainda aumentam nessas linhagens durante o estresse induzido por $^1\text{O}_2$ e diminuem após a transferência das células para o escuro (Fig. 15). Da mesma forma, células das linhagens LS2382 (Δlon) e UJ945 ($\Delta ftsH$) são capazes de induzir a expressão de *sigR* e degradar σ^R após a interrupção do estresse por $^1\text{O}_2$ (Fig. 15). Portanto, os dados

obtidos com essas linhagens mutantes sugerem que σ^R e ChrR não são degradados pelas proteases analisadas.

Figura 15. A estabilidade de σ^R não é afetada *in vivo* por diversas proteases de *C. crescentus*. Os resultados referem-se a análises por Western blot realizadas a partir de extratos protéicos totais de células das linhagens NA1000, LS3706 ($\Delta mmpA$), LS4049 (cepa contendo mutações em CC0151, CC0702, CC1282 e CC2758), LS2382 (Δlon) e UJ945 ($\Delta ftsH$) expostas ao AM 2.5 μ M na presença de luz branca (6 W/m²) por 30 min e, em seguida, transferidas para um ambiente escuro. Aliquotas para a preparação dos extratos foram obtidas durante a exposição ao ¹O₂, nos tempos indicados, e 210 min após a interrupção dessa condição de estresse. Membranas contendo as proteínas dos extratos separadas eletroforéticamente foram incubadas com o anticorpo anti- σ^R e anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina. A banda correspondente ao fator σ^R está indicada na figura. Abaixo de σ^R é mostrada uma banda reconhecida inespecificamente pelo anticorpo anti- σ^R , conforme revelado pelo extrato protéico da linhagem mutante em *sigR* (SG200).

4.1.10. Identificação de genes regulados por σ^R

Dados mostrados acima sugerem que o fator σ^R encontra-se inibido em células de *C. crescentus* sob condições normais de crescimento, provavelmente devido à interação com o fator anti-sigma putativo ChrR. Dessa forma, espera-se que o perfil transcricional da célula praticamente não sofra alteração com a ausência de *sigR*. Contudo, a presença de σ^R ativo na célula durante o crescimento normal pode ser conseguida através da introdução de uma cópia plasmidial de *sigR* sob controle do promotor P_{xyIX} (pRL290). Nessa condição, o nível de ChrR parece não ser suficiente para inibir a totalidade de σ^R , permitindo então que a transcrição dos genes regulados por esse fator sigma aumente na célula.

Dessa forma, a comparação dos perfis transcricionais de células da linhagem parental superexpressando σ^R e de células onde esse fator sigma é expresso em níveis basais representa uma possibilidade para a identificação de prováveis genes regulados por σ^R .

Além de induzir a expressão dos genes que compõem seu regulon, a superexpressão de σ^R na célula também pode resultar no aumento da expressão de genes regulados diretamente por algum membro deste regulon. Todavia, esse aparente problema pode ser minimizado se o perfil transcricional for obtido tão logo σ^R atinja seu nível máximo na célula. Para acessar essa informação, os níveis dessa proteína em células da linhagem NA1000 contendo a construção pRL290 foram mensurados em função do tempo de exposição celular a xilose através de Western blot. Essa análise mostrou que σ^R atinge seu nível máximo de expressão após 30 min na presença desse açúcar e esse nível permanece elevado durante os próximos 210 min em que foram analisados (dados não mostrados). Desse modo, células da linhagem NA1000 contendo a construção pRL290 e expostas a xilose por 30 min foram usadas para obtenção do perfil transcricional na presença de altos níveis de σ^R ativo. Como a expressão de *sigR* a partir de P_{xytX} ocorre mesmo na ausência de xilose no meio, conforme mencionado acima, o perfil transcricional de células contendo σ^R sob a forma inativa foi obtido a partir da linhagem NA1000 contendo o vetor vazio pUJ142 após 30 min de exposição a xilose. Isso também reduz a possibilidade de inclusão de genes não-regulados por σ^R dentro do regulon desse fator sigma, já que a expressão de alguns genes aumenta quando células de *C. crescentus* são crescidas na presença de xilose (Hottes *et al.*, 2004).

A expressão relativa de cada ORF do genoma de *C. crescentus* foi analisada em experimentos de microarranjos de oligonucleotídeos. Nesses experimentos, cDNAs sintetizados a partir do RNA total da linhagem NA1000 ou da cepa superexpressando σ^R foram usados para hibridização competitiva em lâmina contendo oligonucleotídeos correspondentes a cada gene dessa bactéria. Os genes foram

assumidos como sendo diferencialmente expressos quando a razão entre a expressão na cepa com nível aumentado de σ^R e sua expressão na linhagem NA1000 foi maior que 1,5 ou menor que 0,67 em pelo menos 75% das replicas biológicas (três dos quatro experimentos realizados). Usando esse critério, um total de 72 genes com expressão diferencial entre as duas linhagens foram identificados (Tabela 3). Dentre esses genes, 56 foram mais expressos na linhagem com nível aumentado de σ^R , sendo assumidos como prováveis genes regulados por esse fator sigma. Os demais 16 genes tiveram a expressão reduzida quando σ^R foi superexpresso na célula.

Tabela 3. Genes diferencialmente expressos.

Genes com expressão aumentada na cepa superexpressando *sigR* em relação à linhagem parental NA1000.

Gene	Descrição do produto ^a	Expressão relativa ^b
CC0176	general secretion pathway protein G	1.71
CC0229	hypothetical protein	1.65
CC0264	AMP nucleosidase	2.24
CC0351 ^c	conserved hypothetical protein	4.25
CC0353	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein	2.77
CC0358	acid phosphatase	1.60
CC0407	MutT/nudix family protein	1.87
CC0413	hypothetical protein	4.35
CC0415	hypothetical protein	5.99
CC0417	3-ketoacyl-acyl carrier protein reductase, putative	4.62
CC0419 ^c	aldehyde dehydrogenase	2.58
CC0459 ^c	GTP cyclohydrolase I	2.50
CC0462	hypothetical protein	1.56
CC0472	ubiquinol-cytochrome c reductase, iron-sulfur subunit	1.79
CC0482	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	5.82
CC0495	transcriptional regulator, TetR family, putative	1.77
CC0505	hypothetical protein	1.90
CC0646 ^c	deoxyribodipyrimidine photolyase homologous	3.78
CC0647 ^c	transcriptional activator ChrR, putative	2.30
CC0648 ^c	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily	14.50
CC0660	hypothetical protein	2.43
CC0687	hypothetical protein	1.64
CC0921	sensor histidine kinase/response regulator	2.30
CC0939	isopenicillin N epimerase, putative	2.51
CC0974	hypothetical protein	1.86
CC1039 ^c	peptide methionine sulfoxide reductase	1.75
CC1160	hypothetical protein	2.07
CC1179 ^c	hypothetical protein	2.30
CC1248	ribosomal protein L3	1.60
CC1254	ribosomal protein S3	1.65

CC1327	ubiquinone/menaquinone biosynthesis methyltransferase family protein	1.59
CC1427 ^c	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	1.70
CC1428 ^c	deoxyribodipyrimidine photolyase - classI	2.45
CC1491	4-deoxy-L-threo-5-hexosulose-uronate ketol-isomerase	1.85
CC1625	conserved hypothetical protein	1.93
CC1788	AcrB/AcrD/AcrF family protein	1.76
CC2091	ABC transporter. ATP-binding protein	1.99
CC2199	hypothetical protein	1.91
CC2258 ^c	heat shock protein, Hsp20 family	2.10
CC2347	cytosine/purines/uracil/thiamine/allantoin permease family protein	1.70
CC2392	transcriptional regulator, GntR family	2.34
CC2394	vanillate O-demethylase, reductase subunit	1.51
CC2550	conserved hypothetical protein	1.56
CC2555	voltage gated chloride channel family protein	1.73
CC2575	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein	1.52
CC2600 ^c	amine oxidase, flavin-containing	2.36
CC2602 ^c	hypothetical protein	6.24
CC2748 ^c	conserved hypothetical protein	1.76
CC2806	hypothetical protein	1.54
CC2916	hypothetical protein	2.30
CC3012	cytidine deaminase	1.70
CC3508	hypothetical protein	3.17
CC3733	carbohydrate kinase, PfkB family	1.58
	CCrRNA16S 16S rRNA	4.01
	CCrRNA23S 23S rRNA	2.21
	CCrRNA5S 5S rRNA	2.69

Genes com expressão diminuída na cepa superexpressando *sigR* em relação à linhagem parental NA1000.

Gene	Descrição do produto^a	Expressão relativa^b
CC0600	hypothetical protein	0.65
CC0681	hypothetical protein	0.35
CC0684	ABC transporter, HlyB/MsbA family	0.57
CC0820	Smp-30/Cgr1 family protein	0.56
CC0948	hypothetical protein	0.25
CC1093	TonB-dependent receptor, putative	0.54
CC1095	conserved hypothetical protein	0.56
CC1677	acyl carrier protein	0.61
CC1679	conserved hypothetical protein	0.56
CC1771	ubiquinol oxidase subunit III	0.54
CC1781	TonB-dependent receptor	0.43
CC1887	conserved hypothetical protein	0.62
CC1888	hypothetical protein	0.61
CC2026	hypothetical protein	0.65
CC2188	transcriptional regulator, MarR family	0.48
CC2331	DNA-binding protein HU	0.59
CC2540	cell division protein FtsZ	0.58

- a- Segundo a anotação da TIGR
- b- Razão entre a expressão do gene correspondente na cepa superexpressando *sigR* e aquela observada na linhagem parental NA1000.
- c- Genes com expressão aumentada na presença de cádmio, conforme mostrado previamente através de análises de transcriptoma (Hu *et al.*, 2005).

Dentre os prováveis genes regulados por σ^R que foram identificados a partir dessa análise transcricional, *sigR* mostrou a maior expressão diferencial entre as linhagens analisadas (Tabela 3). Isso já era esperado uma vez que várias cópias de *sigR* estão presentes na linhagem superexpressando σ^R , sendo que uma dessas cópias está sob controle de sua própria região promotora e as demais são transcritas a partir de P_{xyIX} . Embora a expressão de *sigR* a partir das cópias plasmidiais desse gene não dependa de σ^R , a transcrição a partir da cópia cromossômica aumenta quando esse fator sigma encontra-se em sua forma ativa, conforme mostrado previamente. Como *sigR* forma uma possível unidade de transcrição com *chrR* e CC0646, a expressão destes genes também deve aumentar na presença de nível elevado de σ^R na célula. De fato, os genes *chrR* e CC0646 também foram considerados como dependentes de σ^R nessa análise transcricional (Tabela 3).

Outros dois genes (CC1427 e CC1428) possivelmente organizados numa mesma unidade de transcrição também foram mais expressos na presença de níveis elevados de σ^R (Tabela 3). O primeiro gene que compõe esse operon putativo (CC1428) codifica uma segunda proteína da família das fotoliasas/ criptocromos encontrada em *C. crescentus*. O gene seguinte (CC1427) codifica uma provável enzima envolvida na formação de um anel ciclopropano ao redor de uma dupla ligação presente em ácidos graxos insaturados. Essa enzima utiliza S-adenosilmetionina (SAM) como doador de grupo metileno para a formação desses anéis (Cronan, 2002). Os dados de microarranjos também mostraram que a mediana da expressão do gene que codifica a enzima S-adenosilmetionina sintetase, responsável pela síntese de SAM a partir de metionina, aumentou quase 1,6x quando σ^R foi superexpresso na célula. No entanto, esse gene não foi assumido como sendo diferencialmente

expresso entre as duas cepas analisadas porque apenas 50% das réplicas biológicas estavam de acordo com o critério adotado. Por outro lado, a expressão do gene que codifica a enzima envolvida na conversão de homocisteína a metionina (homocisteína metiltransferase) foi bastante aumentada na presença de níveis elevados de σ^R na célula (Tabela 3). Durante a síntese do anel ciclopropano, SAM é convertido a S-adenosilhomocisteína (SAH) (Cronan, 2002). A regeneração desse doador de unidades C_1 ocorre inicialmente através da síntese de homocisteína a partir de SAH pela ação de S-adenosilhomocisteinase. O gene que codifica essa enzima também não foi assumido como regulado de σ^R porque apenas 50% das réplicas biológicas mostraram um aumento maior que 1,5x quando esse fator sigma foi superexpresso na célula, apesar de a mediana da expressão desse gene ser de 1,51.

Além de SAM, o composto tetraidrofolato (THF), derivado a partir do ácido fólico, também é usado na célula como doador de unidades C_1 em processos biossintéticos como a conversão de homocisteína em metionina e a síntese de timina e nucleotídeos de purina. A expressão do gene que codifica a enzima GTP ciclohidrolase I, uma das primeiras enzimas envolvidas na via de síntese de ácido fólico, também mostrou ser dependente do nível de σ^R presente na célula (Tabela 3). Além de ser substrato para a síntese de THF, o ácido fólico também atua como co-fator das proteínas da família das fotoliasas/ criptocromos.

Três outros genes que estão provavelmente envolvidos com a disponibilidade de nucleotídeos na célula (CC0264, CC0407 e CC2347) tiveram sua expressão aumentada na cepa que superexpressa σ^R em relação à linhagem parental (Tabela 3). O primeiro desses genes codifica uma possível AMP nucleosidase, uma enzima que hidrolisa AMP em adenina e ribose-5-fosfato. Esses produtos podem ser convertidos posteriormente em nucleotídeos de purina, o que consiste numa alternativa para a síntese *de novo* desses compostos na célula (Pugmire and Ealick, 2002). Além disso, a ribose-5-fosfato pode ser usada para obtenção de energia através de sua conversão em intermediários da via

glicolítica. O gene CC0407 codifica uma dentre as 13 prováveis enzimas da família nudix que devem estar presentes na bactéria *C. crescentus* (Nierman *et al.*, 2001). As proteínas dessa família estão envolvidas na fosforólise de NDP-X, onde X pode ser um grupo fosfato, um açúcar, uma base nitrogenada ou um nucleosídeo (Bessman *et al.*, 1996). O membro melhor caracterizado dessa família (MutT) é responsável pela fosforólise de 8-oxodGTP, sendo responsável por diminuir a incorporação desse nucleotídeo oxidado ao DNA durante a replicação (Michaels and Miller, 1992). Já a função do produto protéico do gene CC2347 parece ser a captação de bases nitrogenadas e seus precursores do meio externo, uma vez que a sequência protéica inferida a partir desse gene se mostra similar à sequência de permeases específicas para essas moléculas.

Um provável gene regulado por σ^R codifica uma metionina sulfóxido redutase putativa presente em *C. crescentus* (Tabela 3). O alvo celular dessa enzima consiste em metionina sulfóxido, uma forma oxidada do aminoácido, que é reduzida novamente a metionina durante a catálise enzimática. A formação desses resíduos oxidados em proteína pode resultar na perda da estabilidade dessa biomolécula. Algumas dessas proteínas desnaturadas são capazes de retornar a sua conformação nativa espontaneamente após a ação da enzima metionina sulfóxido redutase. Em contraste, aquelas proteínas que não se renaturam espontaneamente são auxiliadas no dobramento por chaperones moleculares ou direcionadas para a degradação (Ezraty *et al.*, 2005). As análises de microarranjos também sugerem que os níveis de uma provável chaperone de baixo peso molecular (codificada pelo gene CC2258) e de uma putativa protease de membrana (codificada por CC0229) aumentam quando σ^R é superexpresso na célula (Tabela 3).

Interessantemente, todos os genes correspondentes aos RNAs ribossômicos presentes numa célula bacteriana tiveram sua expressão aumentada na presença de níveis elevados de σ^R . Por outro lado, somente dois genes que codificam proteínas ribossômicas (L3 e S3) parecem ser regulados por esse

fator sigma. Os demais genes envolvidos na síntese protéica não foram considerados como diferencialmente expressos entre as duas linhagens analisadas (Tabela 3).

Outras interessantes funções celulares aparentemente controladas por σ^R são o transporte através da membrana (CC0176, CC0939, CC1788, CC2091 e CC2555), a degradação de ácidos graxos (CC0353 e CC2575) e a oxidação de aldeídos a ácidos carboxílicos (CC0419), que poderiam contribuir para a remoção de intermediários tóxicos produzidos durante a oxidação de biomoléculas nas células.

Para confirmar os resultados obtidos a partir dos experimentos de microarranjos, os níveis de expressão de cinco genes classificados como sendo regulados por σ^R foram analisados por RT-PCR quantitativo. A comparação dos níveis de expressão de cada um desses genes entre as linhagens usadas na análise transcricional (linhagem parental x cepa superexpressando de *sigR*) revelou que níveis aumentados dos transcritos correspondentes a todos os cinco genes analisados são encontrados ao superexpressar *sigR* na célula (Fig. 16A). Como as condições que resultam em aumento da expressão de *sigR* são conhecidas, o efeito da exposição de células de *C. crescentus* a uma dessas condições (tratamento com $^1\text{O}_2$) sobre os níveis de expressão de genes regulados por σ^R também foi investigado. Tais análises mostraram que os cinco genes selecionados são altamente induzidos em células da linhagem NA1000 quando expostas ao AM na presença de luz branca por 30 min, enquanto nenhum aumento significativo foi observado na expressão desses genes em células da linhagem SG200 sob as mesmas condições de estresse (Fig. 16B). A ausência de *sigR* também não afetou a expressão dos genes analisados durante o crescimento normal das células. Juntos, esses resultados validam a estratégia usada para a identificação de genes regulados por σ^R e confirmam que esse fator sigma encontra-se num estado inativo durante o crescimento normal de *C. crescentus*.

Figura 16. Análise da expressão de genes regulados por σ^R . São mostrados resultados de análises por RT-PCR quantitativo realizado para determinar os níveis de expressão de genes selecionados a partir da análise de transcriptoma. A) O RNA total usado na análise de RT-PCR foi extraído de culturas da linhagem NA1000 portando a construção pRL290 (para superexpressar *sigR*) ou o plasmídeo pUJ142 vazio, após serem cultivadas na presença de xilose 0,2% por 30 min. Os valores mostrados referem-se à intensidade do aumento na expressão do gene correspondente na linhagem superexpressando *sigR* comparado com a linhagem NA1000. B) Células das linhagens NA1000 e SG200 ($\Delta sigR$) foram expostas ao AM 2.5 μ M na presença de luz branca (6 W/m²). Amostras de RNA total para as análises de RT-PCR foram obtidas antes e 30 min após o início do estresse. Os valores representam a razão entre a expressão do gene correspondente na linhagem NA1000 submetida (+) ao estresse por ¹O₂ e na linhagem SG200 exposta (+) ou não (-) à mesma condição e a expressão desse mesmo gene na linhagem NA1000 crescendo sob condições normais. Os resultados foram normalizados usando a expressão do gene CC0088 como controle endógeno. Os dados referem-se à média de dois experimentos independentes com os respectivos desvios-padrões.

4.1.11. Identificação da provável sequência promotora reconhecida por σ^R

Resultados mostrados acima sugerem que σ^R regula a expressão do próprio gene que o codifica durante a exposição de células de *C. crescentus* ao cádmio, tBOOH e ¹O₂, provavelmente devido ao reconhecimento de uma sequência específica na região promotora do gene *sigR* por este fator sigma. Assim, a identificação do sítio de início de transcrição de *sigR* durante uma dessas condições de estresse seria útil para a determinação dos elementos promotores provavelmente reconhecidos por σ^R . Através de uma análise de 5'RACE usando RNA de células da linhagem parental exposta ao AM na presença de luz branca por 30 min, foi possível identificar um sítio de início de transcrição do gene *sigR* localizado na posição +7 em relação ao início de tradução (+1) proposto pela TIGR (Fig. 17).

Com base neste início de transcrição determinado experimentalmente, os elementos promotores -35 e -10 da região a montante de *sigR* foram identificados, revelando para o promotor deste gene a sequência TCATC-N₁₇-CGTAT (Fig. 17).

Figura 17. Determinação do início de transcrição dos genes *sigR* (CC0648), CC0459 e CC1428. Experimentos de 5'RACE foram realizados com RNA total extraído de células da linhagem NA1000 após 30 minutos de exposição ao AM 2.5μM na presença de luz branca (6 W/m²). Os inícios de transcrição (+1) dos genes *sigR* (A), CC0459 (B) e CC1428 (C) estão sublinhados nas sequências e aparecem no cromatograma logo após a sucessão de nucleotídeos de timina. As regiões -10 e -35 estão em negrito e o início de tradução sugerido pela anotação do TIGR para cada gene está em itálico.

Como uma tentativa de identificar os possíveis genes regulados diretamente por σ^R , as regiões a montante dos 56 genes assumidos como dependentes deste fator sigma foram analisadas em uma busca pelos elementos promotores reconhecidos por σ^R usando a ferramenta “dna pattern” (van Helden, 2003). Nessa procura, foram permitidas até duas substituições de bases, além da variação em

um nucleotídeo (N₁₆₋₁₇) na extensão da região entre os elementos promotores -35 e -10. Sequências similares a essa foram encontradas na região a montante de outros 15 genes (Tabela 4), os quais são provavelmente regulados diretamente por σ^R . Para obter uma evidência adicional do controle direto da expressão desses genes por σ^R , os sítios de início de transcrição dos genes CC0459 e CC1428 foram determinados por 5'RACE usando RNA de células expostas ao ¹O₂. Para ambos os genes, apenas um único início de transcrição foi identificado (Fig. 17), o qual está em perfeito acordo com aquele sugerido a partir da busca pelos elementos promotores reconhecidos por σ^R na região a montante desses genes (Tabela 4 e Fig. 17).

Tabela 4. Prováveis genes regulados diretamente por σ^R

Gene ou operon	-35	Espaçamento (15/16)	-10	Coordenada ^b
CC0229	TCATT	TTCGCCCCCTTACAAGT	CGTAA	-97
CC0351	ACATC	CGCGTCGACGGCGTTTCG	CGTAT	-34
CC0353	TCGTC	ATGTCGTTTCCCTTTTC	CGTAG	-63
CC0417	TCATC	ATGGGCCTGAACCTGAC	CGAGT	-19
CC0459	GCGTC	TAAGTTTCCGGCCCGGC	CGTAT	-79
CC0648 (CC0646-CC0647) ^a	TCATC	CGTTCCCGCCAAGGCTC	CGTAT	-2
CC0974	CCATC	GTTATGCAAATGGTGG	CGTTT	-170
CC1039	TAACC	GATCGACGTCCGCGTG	CGTAT	-31
CC1428 (CC1427) ^a	TGATC	CACGACGGCTATTCCAG	CGTAT	-43
CC2392	TCCTC	GCATCGTGGTTCGGCGA	CCTAT	-93
CC2555	TCTTC	CCGCGCATCGCCAAGG	CCTAT	-259
CC2575	TCATC	GCCGTAGCCTTCTTTCT	TCATC	-151
CC2602	TCATA	AGTCATAAATCACTTA	CTTAT	+1
CC2748	TAACC	AAACGCCGGGTTGTTG	CGTAT	-10
CC2916	TCAAC	CGTCGCCTCAAGGTCT	TCAAC	-252

a- Genes mostrados entre parênteses são assumidos como sendo co-transcritos com o gene cuja região promotora possui uma sequência putativa para a ligação de σ^R .

b- Corresponde à posição do nucleotídeo 3' da sequência -10 em relação ao início de tradução proposto pela TIGR (+1).

4.1.12. Os genes *sigR*, *cfaS* e CC2258 são essenciais para a sobrevivência de *C. crescentus* ao estresse induzido por $^1\text{O}_2$

Dados mostrados acima sugerem um papel importante para o fator σ^R na proteção de células de *C. crescentus* durante os estresses induzidos por cádmio, tBOOH e $^1\text{O}_2$. A fim de investigar se *sigR* é necessário para a sobrevivência dessa bactéria durante tais condições de estresse, a capacidade de células das linhagens NA1000 e SG200 em sobreviver à exposição ao cádmio, tBOOH ou $^1\text{O}_2$ foi analisada. Contudo, nenhuma sensibilidade aumentada da linhagem SG200 foi observada em relação à cepa NA1000 ao expor células de ambas as linhagens ao CdSO_4 25 μM , tBOOH 100 μM ou AM 2.5 μM na presença de luz branca (dados não mostrados). Uma vez que a expressão de *sigR* pode ainda ser induzida durante o tratamento de células da linhagem parental com concentrações de tBOOH ou AM maiores que 100 e 2,5 μM , respectivamente, condições mais severas desses estresses foram testadas. Apesar disso, diferenças na capacidade de sobrevivência de células das linhagens NA1000 e SG200 não foram observadas durante o tratamento com concentrações mais elevadas de tBOOH (250 μM a 1 mM) (dados não mostrados). Por outro lado, células da linhagem SG200 expostas a 5 μM de AM na presença de luz branca são mais sensíveis que células da linhagem NA1000 submetidas às mesmas condições (Fig. 18). Nesses experimentos, a intensidade de luz branca não foi um fator limitante para a geração de $^1\text{O}_2$, já que o número de células viáveis diminuiu com o aumento da concentração de AM (dados não mostrados).

Figura 18. Os genes *sigR*, *cfaS* e *CC2258* são necessários para a sobrevivência de *C. crescentus* na presença de $^1\text{O}_2$. Curvas de sobrevivência de células das linhagens NA1000, SG200 (ΔsigR), SG211 (ΔcfaS) e SG212 (ΔCC2258) na presença de AM $5\mu\text{M}$ e de luz branca (6 W/m^2). Alíquotas para determinação da viabilidade celular foram retiradas nos tempos indicados após o início do estresse. Os resultados referem-se à média de três experimentos independentes com os respectivos erros-padrões

Para demonstrar que σ^R exerce um papel importante na sobrevivência de células de *C. crescentus* ao $^1\text{O}_2$ por controlar genes que são essenciais para a proteção dessas células durante tal condição de estresse, linhagens mutantes em três genes regulados por σ^R (*msrA*, *cfaS* e *CC2258*) foram construídas. Em cada caso, uma cópia contendo uma deleção interna que mantém o quadro de leitura da respectiva proteína foi construída e usada para substituir sua equivalente no genoma da linhagem NA1000, gerando as linhagens mutantes simples SG210 (ΔmsrA), SG211 (ΔcfaS) e SG212 (ΔCC2258) (Fig. 19). Enquanto nenhum ou apenas um pequeno aumento na sensibilidade da bactéria *C. crescentus* ao $^1\text{O}_2$ foi observado ao deletar os genes *msrA* e *CC2258*, respectivamente, células da linhagem SG211 (ΔcfaS) mostraram-se muito mais sensíveis que a linhagem NA1000 quando submetidas ao estresse induzido por $^1\text{O}_2$ (Fig. 18). Uma vez que os genes *msrA* e *CC2258* parecem agir em concerto no reparo de proteínas oxidadas durante o estresse oxidativo, o efeito da ausência de ambos os genes sobre a sobrevivência de *C. crescentus* ao $^1\text{O}_2$ foi investigado através da construção de um duplo mutante nos genes *msrA* e *CC2258*, denominado SG213 (Fig. 19D). Nesse caso, a cópia original de *msrA* presente no genoma da cepa SG212 foi substituída pela sua equivalente truncada. No

entanto, as análises de sobrevivência revelaram que esse duplo mutante é tão pouco sensível quanto à linhagem SG212 (Δ CC2258). Como esperado, nenhuma diferença de viabilidade entre a linhagem NA1000 e as várias cepas mutantes foi observada durante condições normais de crescimento nem ao expor células dessas linhagens à luz branca na ausência de AM (dados não mostrados).

Figura 19. Obtenção de linhagens mutantes em genes regulados por σ^R . Fragmentos de DNA resultantes de amplificações por PCR foram resolvidos em gel de agarose 1%. Os produtos de amplificação correspondem a um segmento abrangendo a região codificadora de *msrA*, *cfaS* ou CC2258 de diferentes colônias que passaram pelos dois eventos de recombinação usados para a obtenção das linhagens mutantes SG210 (Δ *msrA*, mostrado em A), SG211 (Δ *cfaS*, mostrado em B), SG212 (Δ CC2258, mostrado em C) e SG213 (Δ *msrA*, Δ CC2258, mostrado em D).

4.1.13. *sigR* não está envolvido na resposta de *C. crescentus* a outras condições de estresses analisadas

A fim de investigar se σ^R estaria envolvido na resposta de *C. crescentus* a outras condições de estresse, células da linhagem parental NA1000 contendo a construção pRSR foram tratadas com NaCl 85 mM, sacarose 150 mM, etanol 15%, submetidas à temperatura de 40°C ou cultivadas na ausência de fontes de carbono ou nitrogênio. Contudo, variações significativas da atividade promotora de *sigR* não foram observadas nessas condições de estresse, conforme revelado por ensaios de atividade da enzima β -galactosidase (dados não mostrados). O efeito dos estresses osmótico e térmico e da exposição ao etanol sobre a sobrevivência das linhagens NA1000 e SG200 também foi analisado, mas nenhuma diferença de sensibilidade entre essas linhagens foi verificada. Juntos esses resultados sugerem que o sistema ChrR- σ^R de *C. crescentus* não está envolvido na resposta desta bactéria a essas condições de estresse (dados não mostrados).

4.2. Caracterização do papel de *sigT*, *sigU* e *sigE* na resposta aos estresses osmótico e oxidativo

4.2.1. Organização genômica dos genes *sigT*, *sigU* e *sigE*

O gene *sigT* de *C. crescentus* (CC3475), que codifica o fator sigma ECF σ^T , faz parte de uma provável unidade de transcrição juntamente com uma pequena ORF (CC3476) localizada a sua montante (Fig. 20A). Dentre os fatores sigma ECF com funções conhecidas, RpoE2 de *Sinorhizobium meliloti* é o mais similar (94% de similaridade e 68,2% de identidade) ao fator σ^T de *C. crescentus* (Fig. 20B). Por outro lado, nenhuma similaridade significativa com proteínas previamente caracterizadas foi observada para o produto protéico do gene CC3476. Adicionalmente, esta proteína parece ter uma localização citoplasmática em *C. crescentus*, já que potenciais regiões transmembranas não foram

<i>C. crescentus</i>	MDQQTQKSFERDLIALIPHLRAFARSLCGNAAMADDLAQEAVAKAWASRGSFMTGMTNMKA	60
<i>S. meliloti</i>	MSSENQE-FKREMLAALPSLRAFAMSLIGRHRADDLVQDTIMKAWAQDHFIEIGTNMKA	59
	* * . * . . . * . * * * * * * . * * * * . * . . . * * . * * * * *	
<i>C. crescentus</i>	WTFMILRNQFYSDKRRSWRSVALDQEMAERTLVANTNFDSAIALDDLRQAMLMLENQRE	120
<i>S. meliloti</i>	WLFTILRNELYSQMRKRGREVQDSGDHLTETLAHHPEQYQSLDLQDFRRALQQLPPDQRE	119
	* * * * * . * . * . * . * . . . * * . * . * . * * . * * *	
<i>C. crescentus</i>	ALILIGAGGFSYEEAARMIGVAIGTVKSRVSRARAELVQLFETGHYPRDGKPGAQAMASM	180
<i>S. meliloti</i>	AIILVGASGFSYEEAATICGCALGTIKSRVNRARQRLQEILQV---RGENDYGPDETS	175
	* . * . * . * . * * * * * . * * . * . * . * * * . * * . . . * . *	
<i>C. crescentus</i>	LRDLERLAA	189
<i>S. meliloti</i>	PITSRAFVS	184

```

σT      MVAEQVGRSPDPVRDNSFKRELVTLIPHLRAFARTLTGDPTAADDLAQDAMMKAWDARA 60
σU      -----MDQQTQKSFERDLIALIPHLRAFARSLCGNAAMADDLAQEAVAKAWASRG 50
          *      . . ** . * . . . ***** . * * . . . ***** . * . *** . * .

σT      SFQLGTNMKAWTFMILRNQFYSEKRRSWRQSQLDQEAERTLVAVDDPEAPVALDELRRQG 120
σU      SFTMGTNMKAWTFMILRNQFYSDKRRSWRSVALDQEMAERTLVANTNFDSAIALDDLRRQA 110
          **      . ***** ***** . ***** . ***** ***** . . . . . *** . *** .

σT      LSMLPAEQREALILVGAGGFAYEEAAEICNCAVGTVKSRVSRARRALQAILESGAYDRDG 180
σU      MLMLPENQREALILIGAGGFSYEEAARMIGVAIGTVKSRVSRARAEVLQFETGHYPRDG 170
          . ***      . ***** . ***** . ***** . . . . * . ***** ***** *      . . * . * * ***

σT      AAAGDAMRAILADAERLSALR 201
σU      KPAGQAMASMLRDLERLAA-- 189
          *****      * * * * *

```

Da mesma forma que *sigT*, o gene *sigE* de *C. crescentus* (CC2751), que codifica o fator sigma ECF σ^E , localiza-se a jusante de uma pequena ORF (CC2752), cujo produto não compartilha similaridades significativas com proteínas já caracterizadas (Fig. 22A). Apenas um provável domínio de ligação a Ca^{2+} , conhecido como “EF-hand”, parece estar presente na proteína codificada pelo gene CC2752. Adicionalmente, dois outros genes são transcritos na mesma orientação de *sigE* e codificam proteínas com funções desconhecidas (Fig. 22A). A análise de hidropaticidade das seqüências protéicas

inferidas a partir dos genes localizados adjacientemente ao *sigE* sugere que pelo menos um domínio transmembrana deve estar presente nas proteínas codificadas por esses genes (dados não mostrados). O fator σ^E de *Mycobacterium tuberculosis* aparece como a proteína de função conhecida que compartilha maior similaridade (51%) e identidade (24,5%) com σ^E de *C. crescentus* (Fig. 22B). O fator σ^E de *M. tuberculosis* está envolvido na resposta dessa bactéria ao estresse oxidativo, choque térmico, pH ácido e à exposição a detergentes, sendo também necessário para a sobrevivência dessa bactéria em macrófagos. O gene que codifica esse fator sigma de *M. tuberculosis* também se encontra mapeado no genoma a montante de uma ORF com a qual provavelmente constitui uma unidade de transcrição. Tanto em *C. crescentus* como em *M. tuberculosis*, a ORF localizada imediatamente a jusante do gene que codifica o fator sigma ECF não compartilha similaridade com um fator anti-sigma já caracterizado.

A)

B)

<i>C. crescentus</i>	-----MVSDGNDP-----DDALLAGVGRGDPSAVR-----	25
<i>M. tuberculosis</i>	MELLGGPRVGNTESQLCVADGDDLPTYCSANSEDLNITTTITLSPTSMQVRRDDQWV	60
	*.***.*	. * . . . * . **
<i>C. crescentus</i>	-----TLLDRRLPRILALARRMLNDAGEAEDVAQETFLRA	60
<i>M. tuberculosis</i>	EPSDQLQGTAVFDATGDKATMPSWDELVRQHADRVRRLAYRLSGNQHDAEDLTQETFI	120
	* . . . * . ** * . . . ****.*****.*	
<i>C. crescentus</i>	WKQARSWKPGGARFDTWLHRVALNLCYDRLRRRREVVTDPPEQIDPGPAPDAG----LM	116
<i>M. tuberculosis</i>	FRSVQNYQPG--TFEGWLHRIITNLFDMVRRRARIRMEALPEDYDRVPADEPNPEQIYH	178
	** * . ***** . ** * .*** . . * .** . * ** . . .	
<i>C. crescentus</i>	QSELSRRVEAALAALPARQREAIVLCHHQGLGNIEAAGLMAISVEALESLLSRGRRALK	176
<i>M. tuberculosis</i>	DARLGPDQLQAALASLPPEFRAAVVLCIEGLSYEEIGATLGVKLGTVRSRIHRGRQALRD	238
	...* . .*****.*** . * .*** . ** . * * . ****.*	
<i>C. crescentus</i>	SLADLTRGEA-----	186
<i>M. tuberculosis</i>	YLAAPHEHGECAVHVNPVR	257
	** . .	

(Legenda na próxima página)

Análises não-quantitativas de RT-PCR também foram realizadas para investigar se os genes *sigT* e *sigE* de *C. crescentus* estão de fato organizados em unidades de transcrição juntamente com as respectivas ORFs localizadas a montante dos mesmos. Tais análises mostraram que mRNA correspondendo aos genes *sigT* e CC3476 ou *sigE* e CC2752 parecem estar presentes em células da linhagem NA1000 dessa bactéria (Fig. 23). Além de reforçar a idéia da organização desses genes em operons, tais resultados validam as fusões de transcrição pCM63 e pRSE previamente construídas para inferir os níveis de expressão de *sigT* e *sigE*, respectivamente. Nessas construções, o gene repórter *lacZ* encontra-se sob controle da região localizada a montante do gene CC3476 (pCM63) ou CC2752 (pRSE).

Figura 23. Investigação da organização em operon dos genes *sigT* e CC3476 e de CC2752 e *sigE* em *C. crescentus*. Fragmentos de DNA obtidos a partir de análises de RT-PCR não-quantitativo resolvidos em gel de agarose 1%. Em cada análise, um par de oligonucleotídeos hibribizando em orientação inversa nos genes *sigT* e CC3476 (A) ou em CC2752 e *sigE* (B) foi usado. M refere-se ao marcador de tamanho molecular “1 kb plus” (Invitrogen).

Figura 22. Organização genômica de *sigE*. A) Representação esquemática da possível unidade de transcrição formada pelos genes CC2752, *sigE* (CC2751), CC2750 e CC2749. A região codificadora, o nome do locus e a função predita para o produto protéico de cada gene mapeado nesse operon putativo estão indicados. A figura também mostra a sobreposição entre CC2750 e CC2749 e o espaçamento entre os demais genes. B) Alinhamento entre as seqüências protéicas inferidas a partir dos genes *sigE* de *C. crescentus* e *sigE* de *M. tuberculosis* gerado usando CLUSTALW (Higgins *et al.*, 1996). As posições correspondentes aos aminoácidos idênticos ou conservados são mostradas através de asterisco ou ponto, respectivamente.

4.2.2. O fator σ^T regula a expressão dos genes *sigU* e *sigE*

Conforme mencionado acima, nenhum efeito sobre a atividade promotora de *sigR* foi observado ao superexpressar o gene *sigT* em células da linhagem NA1000. Por outro lado, níveis celulares elevados de σ^T resultaram em aumento das atividades promotoras dos genes *sigT*, *sigU* e *sigE*, como mostrado por ensaios enzimáticos de β -galactosidase usando células contendo as construções pCM63, pRB72 (*lacZ* sob controle da região a montante do gene *sigU*) ou pRSE, respectivamente (Fig. 24A). Tais resultados sugerem que, além de se auto-regular positivamente, *sigT* controla os níveis de expressão de dois outros fatores sigma ECF, σ^E e σ^U .

Para investigar se σ^T regula a expressão de *sigT*, *sigU* e *sigE* durante as condições normais de crescimento de *C. crescentus*, ou se esse controle ocorre somente em condições nas quais esse fator sigma se torna ativo na bactéria, a atividade promotora desses genes foi inferida em células de uma linhagem mutante em *sigT*, denominada ML161, previamente construída por Michael T. Laub (MIT). Tais análises revelaram que alterações significativas das atividades promotoras de *sigT* e *sigE* não são evidentes em células da linhagem ML161 quando comparado com células da linhagem NA1000, sugerindo que as expressões desses genes durante o crescimento normal de *C. crescentus* são dependentes de pelo menos um outro fator sigma (Fig. 24B). Por outro lado, a ausência de σ^T em células dessa bactéria resulta numa marcante diminuição da atividade promotora de *sigU*, já que somente níveis basais de atividade da enzima β -galactosidase são observados em células da linhagem ML161 (Fig. 24B). Portanto, esse resultado sugere que σ^T regula a expressão de *sigU* mesmo durante condições normais de crescimento.

Figura 24. O gene *sigT* regula independentemente a expressão de *sigU* e *sigE*. Atividade promotora dos genes *sigT*, *sigU* e *sigE* determinada por meio de ensaios de atividade de β -galactosidase em células portando as construções pCM63, pRB72 e pRSE, respectivamente. A) Células da linhagem NA1000 portando a construção pRL480 (para superexpressar *sigT*) ou o vetor pJS14 vazio. B) Células da linhagem NA1000 ou do mutante nulo em *sigT* ML161. C) Células dos mutantes SG546 (*sigU*:: Ω) e SG100 (Δ *sigE*) e da linhagem NA1000 portando a construção pCM7 (para superexpressar *sigU*), pRL180 (para superexpressar *sigE*) ou o vetor pJS14. Os sinais (-), (+) e (++) correspondem aos seguintes níveis de expressão do gene correspondente: ausente (linhagens mutantes nulos), basal (linhagem NA1000) e aumentado (NA1000 superexpressando *sigT*, *sigU* ou *sigE*). Os resultados correspondem à média de três experimentos independentes com os respectivos erros-padrões.

A fim de investigar se σ^T regula a expressão de *sigU* e *sigE* independentemente, ou se um desses genes é responsável por mediar a indução da expressão do outro gene, constituindo uma ampla cascata de ativação de fatores sigma ECF em *C. crescentus*, a atividade promotora dos genes *sigU* e *sigE* foi inferida em células com níveis aumentados de σ^U ou σ^E . Resultados obtidos a partir dessas

análises mostraram que a atividade promotora de *sigU* não é afetada pela superexpressão de *sigE*, e que níveis aumentados de σ^U também não alteram a atividade promotora do gene *sigE* (Fig. 24C). Todavia, a superexpressão de um desses fatores sigma resulta no aumento da atividade promotora do próprio gene que o codifica (Fig. 24C). Para verificar o efeito da ausência de *sigE* sobre a expressão deste próprio gene em *C. crescentus*, uma linhagem mutante nulo em *sigE*, denominada SG100, foi obtida através da substituição da cópia original desse gene pela sua equivalente truncada no genoma da linhagem NA1000 (Fig. 25). Contudo, a atividade promotora de *sigE* não foi afetada com a deleção desse gene (Fig. 24C), sugerindo que σ^E não participa do controle do próprio gene que o codifica durante o crescimento normal de *C. crescentus*. Similarmente, nenhuma alteração da atividade promotora de *sigU* foi observada na linhagem mutante SG546 (*sigU::* Ω) previamente construída quando comparado com a linhagem NA1000 (Fig. 24C).

Figura 25. Obtenção de uma linhagem mutante no gene *sigE*. Fragmentos de DNA resultantes de amplificações por PCR resolvidos em gel de agarose 1%. Os produtos de amplificação correspondem a um segmento abrangendo a região codificadora de *sigE* de diferentes colônias que passaram pelos dois eventos de recombinação usados para a obtenção das linhagens SG100 ($\Delta sigE$).

O efeito da superexpressão de *sigR* sobre a atividade promotora de *sigU* e *sigE* também foi verificado. Contudo, células contendo altos níveis de σ^R mostram atividades dessas regiões promotoras similares àquelas observadas em células expressando esse fator sigma em níveis basais, indicando que σ^R não está envolvido no controle da expressão dos genes *sigU* e *sigE* (dados não mostrados).

4.2.3. Os genes *sigT*, *sigU* e *sigE* são induzidos durante o choque hiperosmótico

Conforme mostrado previamente, os níveis de expressão dos genes *sigT* e *sigU* em células cultivadas em meio definido (M2) são maiores que os níveis detectados quando as células são crescidas em meio complexo (PYE) (Hottes *et al.*, 2004). Ensaio enzimáticos de β -galactosidase realizados a partir de células da linhagem NA1000 cultivadas em M2 ou PYE também mostraram os mesmos resultados referente à expressão dos genes *sigT* (Fig. 26A) e *sigU* (Fig. 26B) nesses meios de crescimento. Adicionalmente, uma maior atividade promotora do gene *sigE* foi observada ao cultivar células da linhagem NA1000 de *C. crescentus* em meio M2 (Fig. 26C). Embora não tenha sido mostrado anteriormente, esse dado está de acordo com a observação de que a expressão de *sigE* é dependente de σ^T .

Uma possível explicação para a indução dos genes *sigT*, *sigU* e *sigE* durante o crescimento de *C. crescentus* em meio definido seria a de que solutos presentes no meio complexo estariam minimizando o efeito de determinados estresses, como o choque osmótico ou oxidativo, sobre essa bactéria. De fato, análises prévias da expressão de *sigU* durante várias condições de estresse revelaram que este gene é induzido sob condições de hiperosmolaridade quando as células são crescidas em meio PYE. Para melhor caracterizar a indução de *sigU* e investigar se os níveis de expressão de *sigT* e *sigE* são também afetados durante os estresses osmótico e oxidativo, células da linhagem NA1000 foram tratadas com NaCl 85 mM, sacarose 150 mM ou H₂O₂ (0,05- 2,5 mM). Embora nenhuma alteração da atividade promotora de *sigT*, *sigU* e *sigE* tenha sido observada durante a exposição de células dessa linhagem ao H₂O₂, induções significativas da atividade promotora desses genes ocorreram durante o tratamento celular com NaCl 85 mM ou sacarose 150 mM, conforme revelado por ensaios enzimáticos de β -galactosidase (Fig. 26). Induções similares da atividade promotora dos genes *sigU* e *sigE* foram ainda observadas nas linhagens mutantes SG546 ($\Delta sigU$) e

SG100 ($\Delta sigE$), respectivamente, indicando que esses genes não são auto-regulados durante o estresse osmótico em *C. crescentus*. No entanto, a indução da expressão dos genes *sigT*, *sigU* e *sigE* durante o crescimento em meio M2 ou sob condições de hiperosmolaridade foi afetada em células da linhagem ML161 ($\Delta sigT$) (Fig. 26). Tal resultado sugere que σ^T é capaz de induzir a expressão do próprio gene que o codifica bem como dos genes *sigU* e *sigE* durante o estresse osmótico na bactéria *C. crescentus*.

Figura 26. Os níveis de expressão dos genes *sigT*, *sigU* e *sigE* aumentam durante o crescimento celular em meio mínimo e na presença de NaCl ou sacarose de modo dependente de σ^T . Atividade promotora dos genes *sigT* (A), *sigU* (B) e *sigE* (C) determinada por meio de ensaios de atividade de β -galactosidase em células portando as construções pCM63, pRB72 e pRSE, respectivamente. Células das linhagens NA1000, ML161 ($\Delta sigT$), SG546 (*sigU*:: Ω) e SG100 ($\Delta sigE$) foram cultivadas em meio complexo PYE ou meio mínimo M2. Culturas em fase exponencial crescidas em M2 também foram expostas a NaCl 85 mM ou sacarose 150 mM por 2 h. Os resultados correspondem à média de três experimentos independentes com os respectivos erros-padrões.

4.2.4. O gene CC3476 regula negativamente a expressão dos genes *sigT* e *sigU*

Os dados mostrados na seção anterior sugerem a presença de um gene em *C. crescentus* atuando no controle da expressão de *sigT*, *sigU* e *sigE*. Embora a ORF CC3476 não compartilhe similaridade em nível de sequência com genes codificando fatores anti-sigma, sua organização numa provável unidade de transcrição com *sigT* faz dela um forte candidato para ser o regulador da resposta mediada por σ^T . Para investigar essa possibilidade, o gene CC3476 foi superexpresso em células da linhagem NA1000 através de uma cópia plasmidial do mesmo sob controle de um promotor constitutivo P_{lacZ} (construção pRL580). Ensaio enzimáticos de β -galactosidase mostraram que níveis aumentados do produto do gene CC3476 suprimem a indução da atividade promotora dos genes *sigT* e *sigU* durante o estresse osmótico causado pela exposição celular ao NaCl 85 mM ou sacarose 150 mM, além de resultar numa drástica diminuição da expressão de *sigU* em condições normais de crescimento (Fig. 27). Portanto, esses resultados indicam que, embora σ^T esteja presente nas células superexpressando o gene CC3476, esse fator sigma não é mais capaz de regular a expressão dos genes *sigT* e *sigU*, provavelmente devido ao efeito inibitório do produto do gene CC3476 sobre a atividade de σ^T .

Figura 27. Efeito do gene CC3476 sobre a expressão de *sigT* e *sigU*. Atividade promotora dos genes *sigT* e *sigU* determinadas por meio de ensaios de atividade de β -galactosidase em células portando as construções pCM63 e pRB72, respectivamente. Células da linhagem NA1000 portando a construção pRL580 (para superexpressar CC3476) (++) ou o vetor pJS14 vazio (+) cultivadas em meio M2 foram expostas a NaCl 85 mM ou sacarose 150 mM por 2 h. Os resultados correspondem à média de três experimentos independentes com os respectivos erros-padrões.

4.2.5. O gene *sigT* confere resistência a *C. crescentus* durante os estresses osmótico e oxidativo

Uma vez que *sigT* exerce um papel importante na bactéria *C. crescentus* durante condições de hiperosmolaridade, controlando sua própria expressão bem como a de dois outros genes que codificam fatores sigma ECF, a contribuição relativa de *sigT* para a sobrevivência dessa bactéria ao estresse osmótico foi investigada. Tais análises de sobrevivência mostraram que a ausência de *sigT* resulta no aumento de sensibilidade da bactéria *C. crescentus* ao tratamento com NaCl 85 mM (Fig. 28A) ou sacarose 150 mM (Fig. 28B). Contudo, células das linhagens mutantes em *sigU* (SG546) ou *sigE* (SG100) não se mostraram diferentes das células da linhagem NA1000 em relação à porcentagem de sobrevivência ao longo do estresse osmótico (dados não mostrados).

Interessantemente, uma maior sensibilidade ao estresse oxidativo induzido por H₂O₂ 2,5 mM também foi observada em células da linhagem ML161 (Δ *sigT*) quando comparado com células da linhagem NA1000 (Fig. 28C), apesar de um controle transcricional dos genes *sigT*, *sigU* e *sigE* não ter sido notado durante essas condições de estresse. Como observado sob condições de hiperosmolaridade, a ausência de *sigU* ou *sigE* não afeta a sobrevivência de *C. crescentus* durante o estresse induzido por H₂O₂ (dados não mostrados).

Figura 28. O gene *sigT* é necessário para a sobrevivência de *C. crescentus* na presença de NaCl, sacarose ou H₂O₂. Curvas de sobrevivência de células das linhagens NA1000 e ML161 ($\Delta sigT$), na presença de NaCl 85 mM (A), sacarose 150 mM (B) ou H₂O₂ 2,5 mM(C). Aliquotas para a determinação da viabilidade celular foram retiradas nos tempos indicados após o início do estresse. Os resultados referem-se à média de três experimentos independentes com os respectivos erros-padrões.

5. Discussão

5.1. Resposta transcricional ao estresse oxidativo mediada por σ^R em *C. crescentus*

Os dados apresentados neste trabalho descrevem um sistema molecular envolvido na resposta de *C. crescentus* à radiação UVA e ao cádmio, duas condições ambientais provavelmente encontradas por essa bactéria em seu habitat natural. Esses dados também suportam a hipótese de que $^1\text{O}_2$ e/ou hidroperóxido orgânico são responsáveis por mediar a resposta de *C. crescentus* à radiação UVA, enquanto a resposta dessa bactéria ao cádmio não ocorre via ERO. Esse sistema molecular de *C. crescentus* é bastante semelhante ao sistema σ^E -ChrR de *R. sphaeroides*, o qual está envolvido na resposta desta bactéria ao estresse fotooxidativo induzido pela exposição celular à luz azul (Anthony *et al.*, 2005). O $^1\text{O}_2$, que é gerado através de reações fotoquímicas no aparato fotossintético de *R. sphaeroides*, também foi considerado como o responsável por mediar a resposta ao estresse fotooxidativo nessa bactéria (Anthony *et al.*, 2005). Como *C. crescentus* não é um organismo fototrófico, a quantidade de $^1\text{O}_2$ gerada em células expostas à luz visível parece ser inferior àquela provavelmente encontrada em células de *R. sphaeroides* submetidas à mesma condição de estresse. De fato, somente um ligeiro aumento na atividade promotora do gene *sigR* foi observado durante a exposição de *C. crescentus* à luz branca na ausência de AM. Embora dados referentes à atividade de σ^E durante a exposição de *R. sphaeroides* à radiação UVA não estejam disponíveis, é provável que uma maior atividade desse fator sigma seja também observada durante essa condição de estresse, já que a geração de $^1\text{O}_2$ em células expostas à radiação UVA é bem conhecida (Baier *et al.*, 2006).

A identificação do início de transcrição de *sigR* sob condição de estresse por $^1\text{O}_2$ sugere que outro códon deve ser usado para iniciar a tradução do mRNA correspondente a este gene. A mesma suposição pode ser feita a partir dos resultados de um trabalho recente no qual foram determinados os inícios de transcrição de genes, incluindo *sigR* (posição +6 em relação ao início de tradução proposto

pela TIGR), durante a exposição de células de *C. crescentus* ao cádmio (McGrath *et al.*, 2007). Assumindo que o início de tradução de *sigR* corresponde ao segundo resíduo de valina da sequência de σ^R proposta pela TIGR, nota-se que a diferença de tamanho entre esse fator sigma e seu ortólogo σ^E de *R. sphaeroides* é diminuída (Fig. 2A).

A fotoreativação de dímeros de pirimidina e a modificação de ácidos graxos insaturados são funções controladas tanto por σ^R em *C. crescentus* como por σ^E em *R. sphaeroides* (Anthony *et al.*, 2005). Embora os dímeros de pirimidina sejam produto do efeito direto da radiação UV (Ravanat *et al.*, 2001), não sendo causados pela ação de 1O_2 e/ou hidroperóxido orgânico sobre o DNA, a geração dessas EROs durante a radiação UVA consiste numa maneira de sinalizar às células da ocorrência desta condição de estresse e, por conseguinte, induzir a expressão de genes envolvidos no reparo dessas lesões no DNA. O gene CC1428 de *C. crescentus* está provavelmente envolvido em tal função, já que seu ortólogo em *R. sphaeroides*, denominado *phrA*, codifica uma fotoliase funcional (Hendrischk *et al.*, 2007). Por outro lado, o envolvimento do gene CC0646 no reparo direto de dímeros de pirimidina em *C. crescentus* é menos claro, uma vez que o gene de *R. sphaeroides* pertencente à família das fotolases/ criptocromos que compartilha a maior similaridade com CC0646 não é necessário para a fotoreativação nesta bactéria (Hendrischk *et al.*, 2007). Como algumas proteínas pertencentes a essa família agem como receptores de luz azul (criptocromos) ao invés de reparar danos no DNA (Ahmad *et al.*, 1998), o gene CC0646 de *C. crescentus* poderia alternativamente atuar como sensor de luz azul, estimulando a migração dessa bactéria para locais de menor incidência de radiação de UVA. Embora os fotoreceptores sejam ativados por luz azul, tem sido demonstrado que esse tipo de radiação comumente coexiste em ambientes naturais com a radiação ultravioleta, a qual é bem mais letal que o componente visível da luz solar. Contudo, somente uma caracterização bioquímica poderia elucidar os papéis das proteínas codificadas pelos genes CC0646 e CC1428 em *C. crescentus*.

A atividade aumentada de ciclopropanação de duplas ligações poderia proteger as células de *C. crescentus* e *R. sphaeroides* durante condições ambientais que resultam na geração de EROs. Embora nenhuma propriedade física ou química do ácido graxo seja alterada (Cronan, 2002), a substituição de uma dupla ligação por um anel ciclopropano provavelmente torna essa molécula mais resistente à peroxidação, já que a reatividade de uma EROs com um ácido graxo depende do nível de saturação desta molécula (Halliwell, 1999).

Por outro lado, a detoxificação de peróxidos e a remoção de intermediários tóxicos mediadas por glutathione, que são funções induzidas por σ^E durante o estresse por 1O_2 em *R. sphaeroides* (Anthony *et al.*, 2005), não parecem ser controladas por σ^R em *C. crescentus*. Tais funções também poderiam ser induzidas nessa bactéria na presença de 1O_2 , mas sob controle de um outro gene regulador. É também provável que σ^R não esteja envolvido no controle dos níveis de expressão de outro fator sigma, em uma cascata de ativação, como observado em *R. sphaeroides* (Anthony *et al.*, 2005). Interessantemente, quatro ORFs aqui identificadas como dependentes de σ^R foram recentemente classificadas como regiões intergênicas (IRs) usando ferramentas melhoradas para a predição de ORFs em genomas (Landt *et al.*, 2008). Como já observado para algumas das novas regiões intergênicas preditas em *C. crescentus*, é também possível que as IRs dependentes de σ^R correspondam a pequenos RNAs não-codificadores, os quais poderiam ser responsáveis pela regulação pós-transcricional dos genes em cujas regiões regulatórias não foram encontradas seqüências que podem ser reconhecidas por σ^R .

O fator σ^R de *C. crescentus* é aparentemente capaz de regular funções celulares que não estão sob controle de σ^E em *R. sphaeroides*, como o reparo de proteínas e a manutenção do pool de nucleotídeos e do aminoácido metionina. A análise da seqüência do gene CC2258 de *C. crescentus* mostrou que resíduos de metionina estão ausentes na chaperone de baixo peso molecular codificada

por esse gene. Este fato permite supor que em *C. crescentus*, o reparo de proteínas através de dois estágios (redução dos resíduos de metionina sulfóxido, seguido pela renaturação da proteína de maneira dependente de uma chaperone de baixo peso molecular) ocorre provavelmente mesmo em condições de estresse oxidativo intenso, diferentemente de *Mycobacterium tuberculosis* (Abulimiti *et al.*, 2003). Neste organismo e nas mesmas condições, as proteínas oxidadas são aparentemente direcionadas para a degradação, já que a atividade da chaperone molecular encontra-se comprometida devido à oxidação de seus resíduos de metionina. De qualquer maneira, tanto em *C. crescentus* como em *M. tuberculosis*, as proteínas desenoveladas em consequência do estresse oxidativo, podem ser eliminadas da célula, evitando o efeito tóxico do acúmulo de tais proteínas. Durante as condições de estresse oxidativo intenso em *M. tuberculosis*, a chaperone de baixo peso molecular parece ter outro papel fisiológico: desativação de EROs através de sucessivos ciclos de oxidação dos resíduos de metionina e redução dos mesmos via metionina sulfóxido redutase (Abulimiti *et al.*, 2003).

A indução mediada por σ^R da expressão dos genes codificando proteínas envolvidas na hidrólise, fosforólise, síntese *de novo* ou captação de nucleotídeos pode ter um significado importante durante os estresses induzidos por cádmio, hidroperóxidos orgânicos ou $^1\text{O}_2$ em *C. crescentus*: repor os nucleotídeos oxidados. Embora a hidrólise e a fosforólise de nucleotídeos contribuam de forma imediata para a degradação destes constituintes celulares, os produtos da degradação podem ser utilizados como precursores para a síntese de novos nucleotídeos. Em adição, σ^R parece ter um papel importante no controle de metionina nas células, estimulando tanto a síntese como o reparo desse aminoácido. Assim, sucessivos ciclos de oxidação e redução de metionina livre ao invés de uma chaperone de baixo peso molecular poderia contribuir para a desativação de EROs nas células de *C. crescentus*.

A fim de permitir a continuidade da tradução em células expostas ao estresse oxidativo, σ^R induz a síntese dos três distintos rRNAs. Tal indução parece ser importante para a célula uma vez que as moléculas de RNA também são oxidadas na presença de EROs.

Os dados disponíveis sugerem que σ^R é responsável por mediar a indução da expressão de alguns dos genes previamente identificados como sendo regulados por cádmio em *C. crescentus* (Hu *et al.*, 2005). Dentre os 18 genes que são provavelmente regulados de maneira direta por σ^R , 10 tiveram a expressão aumentada quando células desta bactéria foram expostas a cádmio (Hu *et al.*, 2005). Adicionalmente, apenas quatro genes induzidos por cádmio foram assumidos como sendo regulados indiretamente por esse fator sigma. Tais observações sugerem que o conjunto de genes previamente identificado como sendo induzido durante a exposição de células de *C. crescentus* ao cádmio constitui uma resposta inicial da bactéria a este metal pesado. De fato, análises de western blot revelaram que o nível de σ^R em células submetidas às mesmas condições que àquelas usadas durante a análise transcricional de *C. crescentus* ao cádmio (CdCl_2 6 μM por 30 min) (Hu *et al.*, 2005) não correspondem ao máximo observado (CdSO_4 25 μM por 60 min) (dados não mostrados). Portanto, a presença de promotores fortes, além daquele provavelmente reconhecido por σ^R , controlando os seus níveis de expressão poderia explicar porque alguns genes regulados diretamente por este fator sigma não foram detectados anteriormente durante o estresse por cádmio (Hu *et al.*, 2005). Da mesma forma, os quatro genes assumidos como sendo regulados indiretamente por σ^R podem ter sido induzidos durante o estresse por cádmio pela ação de um outro fator sigma ou um regulador transcricional, o qual tem sua atividade e/ou expressão induzidas por este metal pesado.

O caráter transitório da indução do gene *sigR* na presença de cádmio indica que as células de *C. crescentus* possuem mecanismos de resistência envolvidos na remoção desse metal pesado do citoplasma e/ou na diminuição de sua toxicidade. De fato, a expressão de genes codificando proteínas

responsáveis pelo efluxo de metais ou pela síntese de glutathione é aumentada durante o tratamento dessa bactéria com cádmio (Hu *et al.*, 2005). Da mesma forma, a ativação de mecanismos envolvidos na detoxificação de hidroperóxidos orgânicos, incluindo catalases e peroxidases, poderia contribuir para a diminuição dos níveis de σ^R ao longo do estresse induzido por tBOOH. Todavia, nenhum desses mecanismos de resistência a cádmio ou a hidroperóxidos orgânicos está aparentemente sob controle deste fator sigma. Adicionalmente, outros mecanismos envolvidos no reparo de danos oxidativos ou na remoção de intermediários tóxicos além daqueles regulados por σ^R devem existir em *C. crescentus*, com base nas funções previstas para os genes identificados nessa bactéria (Nierman *et al.*, 2001). Em conjunto, tais observações poderiam explicar porque a ausência de *sigR* não resulta na diminuição da resistência de *C. crescentus* aos estresses causados por cádmio ou hidroperóxido orgânico, mesmo usando concentrações letais de tBOOH. Por outro lado, os mecanismos de resistência sob controle de σ^R tornam-se necessários para a sobrevivência de *C. crescentus* quando os danos oxidativos nessa bactéria são constantemente gerados durante a exposição de tais células à luz branca na presença de AM por até 24 h. Do mesmo modo, o gene *cfaS* somente aparece como essencial para *C. crescentus* quando essa bactéria é tratada com 1O_2 por longos períodos, provavelmente porque os mecanismos de detoxificação de hidroperóxidos orgânicos são suficientes para proteger os fosfolípidos durante exposições mais curtas ao 1O_2 . Adicionalmente, genes parálogos de CC1039 e CC2258 (CC0994 e CC3592, respectivamente) que são codificados pelo genoma de *C. crescentus* parecem ser suficientes para o reparo da maioria das moléculas protéicas em células mutantes em CC1039 e/ou CC2258.

Comparando os resultados obtidos a partir de ensaios enzimáticos de β -galactosidase com aqueles provenientes de análises por Western blot, observa-se que a enzima β -galactosidase é bastante estável em células de *C. crescentus*, uma vez que atividades aumentadas dessa enzima são evidentes mesmo 4

h após a adição de tBOOH, ao passo que se observa níveis praticamente não detectáveis de σ^R 60 min após o início do estresse. Observações semelhantes também poder ser feitas ao longo do tratamento de *C. crescentus* com cádmio. Adicionalmente, as intensidades de aumento da atividade da β -galactosidase foram sempre inferiores às sugeridas pelas análises dos níveis de σ^R (embora densitometrias não tenham sido realizadas), indicando que o estresse oxidativo afeta negativamente a atividade dessa enzima. Todavia, observa-se que a atividade da β -galactosidase aumenta em células de *C. crescentus* enquanto níveis elevados de σ^R são detectados. Portanto, apesar de as análises da atividade da enzima β -galactosidase ao longo das condições de estresse em *C. crescentus* não fornecer dados verdadeiros acerca de intensidades e cinéticas de indução, informações confiáveis referentes à ocorrência e duração de induções podem ser obtidas nessas análises.

5.2. Papel de ChrR na percepção de condições de estresse em *C. crescentus*

Uma diferença interessante entre os sistemas σ^R -ChrR de *C. crescentus* e σ^E -ChrR de *R. sphaeroides* consiste na ausência do motivo de ligação ao zinco HxxxCxxC na extremidade N-terminal da proteína ChrR de *C. crescentus*. Tal observação exclui a possibilidade de que esse metal estaria envolvido na manutenção da estrutura desta proteína, em contraste com o que foi observado para ChrR de *R. sphaeroides* (Newman *et al.*, 2001). Apesar dessa diferença, uma conservação geral é ainda evidente ao comparar as seqüências da porção N-terminal (resíduos 1 a 77) das proteínas ChrR de *C. crescentus* e *R. sphaeroides* (Fig. 4B), sugerindo que a porção N-terminal da proteína de *C. crescentus* corresponde ao domínio responsável pela atividade de anti-sigma. Adicionalmente, a porção N-terminal de muitos fatores anti-sigma não relacionados à proteína ChrR (que compartilham similaridade muito baixa em nível de seqüência), como RseA de *E. coli*, é capaz de dobrar-se numa estrutura semelhante ao domínio N-terminal de ChrR, apesar de a maioria também não possuir um

motivo de ligação ao zinco. A ausência do motivo HxxxCxxC em ChrR de *C. crescentus* também sugere que zinco não está envolvido na percepção do estado oxidativo da célula, ao contrário do que foi mostrado para o fator anti-sigma RsrA de *Streptomyces coelicolor* (Paget *et al.*, 2001b). Dados obtidos com o sistema σ^E -ChrR de *R. sphaeroides* revelaram que a porção C-terminal de ChrR é necessária para a percepção de $^1\text{O}_2$ (Campbell *et al.*, 2007). Portanto, a observação de que os dois resíduos conservados de cisteína requeridos para a percepção de cádmio estão localizados na porção C-terminal de ChrR de *C. crescentus* reforça a hipótese da modularidade funcional de ChrR. Segundo essa hipótese, a porção N-terminal estaria envolvida na ligação ao fator sigma, enquanto o estresse oxidativo seria sentido pela porção C-terminal da proteína (Campbell *et al.*, 2007).

Consistente com a ausência de potenciais domínios transmembrana em ChrR, foi observado que proteases pertencente à via RIP, a qual está envolvida na degradação de proteínas de membrana, não são requeridas para o controle da estabilidade deste fator anti-sigma putativo. Similarmente, nenhum papel na degradação de ChrR foi atribuído para a protease ClpXP através de ensaios *in vitro* realizados em colaboração com Tania Baker (Cambridge) e Michal Laub (MIT) (dados não mostrados). Tais observações sugerem que o mecanismo de inativação de ChrR em *C. crescentus* é diferente daquele já descrito para a inativação de fatores anti-sigma associados à membrana (Alba *et al.*, 2002; Schobel *et al.*, 2004). Ao invés disso, os dados apresentados aqui sugerem uma inativação de ChrR resultante de alteração conformacional.

A capacidade das proteínas mutantes ChrR/C186S and ChrR/C188S em perceber os diferentes estresses sugere que $^1\text{O}_2$ e hidróperóxido orgânico levam à inativação de ChrR através de um mecanismo distinto daquele observado na presença de cádmio. Por analogia à proteína ChrR de *R. sphaeroides* (Newman *et al.*, 2001), é também possível que os resíduos C186 e C188 de ChrR de *C. crescentus* estejam acessíveis a modificações químicas. No entanto, a oxidação desses resíduos por

alguma ERO ou diamida não parece inativar ChrR, em contraste com o que foi observado em alguns reguladores transcricionais ou fatores anti-sigma (Fuangthong *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004; Paget *et al.*, 2001a). Ao contrário das EROs, cádmio e outros metais pesados são capazes de se ligar a grupos sulfidrilas em proteínas (Stohs and Bagchi, 1995), e essa propriedade poderia explicar porque os resíduos C186 e C188 são requeridos para a percepção de cádmio, mas não de EROs. É interessante notar que a substituição de um único resíduo de cisteína é capaz de abolir completamente a capacidade de *C. crescentus* em sentir cádmio, sugerindo que a inativação de ChrR depende da ligação desse metal a ambos os resíduos de cisteína. Da mesma forma, mais de um resíduo de cisteína está envolvido na associação de cádmio com metalotioneínas em células eucarióticas. Alternativamente, o resíduo conservado de cisteína remanescente nas proteínas ChrR/C186S e ChrR/C188S não estaria mais acessível ao cádmio devido a pequenas alterações conformacionais dessas proteínas mutantes. É também possível que diferentes reatividades de cádmio e níquel com os resíduos C186 e C188 contribuam para os efeitos distintos desses metais sobre a atividade de ChrR. Como cádmio parece agir diretamente sobre ChrR, não sendo seu efeito celular mediado por $^1\text{O}_2$ e/ou hidroperóxido orgânico, a inativação mais lenta dessa proteína por cádmio relativamente àquela observada em células expostas a $^1\text{O}_2$ ou tBOOH poderia ser explicada assumindo diferentes acessibilidades desses indutores aos seus resíduos alvos em ChrR.

O efeito supressor do zinco sobre a indução da expressão de *sigR* mediada por cádmio pode ser consequência de uma possível competição entre esses metais por transportadores localizados na membrana interna de *C. crescentus*. Dessa forma, quando zinco é administrado a culturas dessa bactéria antes do tratamento com cádmio, a inativação de ChrR ainda pode ocorrer usando concentrações relativamente baixas de zinco, já que boa parte deste metal deve ter sido captado pela bactéria antes da adição do cádmio, diminuindo, portanto, a competição entre os metais pelos

transportadores. No entanto, a inativação de ChrR não é observada se ambos os metais forem adicionados concomitantemente à cultura, condição na qual uma competição maior é esperada.

Ao contrário do mecanismo de inativação de ChrR por cádmio, do qual se tem evidência de uma ação direta desse metal pesado sobre a proteína, os dados disponíveis não permitem estabelecer se $^1\text{O}_2$ e hidroperóxidos orgânicos também agem diretamente sobre ChrR ou se oxidam uma outra proteína, a qual interage com ChrR afetando sua função. Além dos resíduos C186 e C188, três resíduos de histidina são altamente conservados na porção C-terminal de ChrR de diferentes bactérias, o que torna tais resíduos forte candidatos para serem alvos de modificação direta por $^1\text{O}_2$. Uma vez que mecanismos de reparo de histidina não são conhecidos, a oxidação desses resíduos em ChrR poderia levar à inativação irreversível dessa proteína e, como consequência, a síntese *de novo* de ChrR seria necessária para a inativação de σ^R uma vez que o estresse fosse interrompido na célula. Por outro lado, uma inativação reversível de ChrR é esperada durante a exposição de *C. crescentus* ao cádmio, já que os resíduos oxidados de cisteína (provavelmente resultantes da dissociação desse metal de ChrR) poderiam ser prontamente reparados nas células. Consistente com essas suposições, foi observado que a diminuição dos níveis de σ^R após a interrupção do estresse por $^1\text{O}_2$ é mais lenta que àquela notada ao longo da exposição celular ao cádmio.

Com base nos dados disponíveis, é também difícil prever como um hidroperóxido orgânico poderia agir sobre ChrR. Parece que hidroperóxidos orgânicos levam à inativação de ChrR através de um mecanismo independente de $^1\text{O}_2$, já que tBOOH não é capaz de gerar $^1\text{O}_2$ diretamente pelo mecanismo de Russell (REF). Em adição, hidroperóxidos orgânicos são incapazes de oxidar resíduos de histidina, a menos que metais como cobre ou ferro estejam associados a esses resíduos. Contudo, a observação de que a proteína ChrR de *R. sphaeroides* coordena um segundo íon Zn^{2+} através de seus resíduos conservados de histidina (Campbell *et al.*, 2007) exclui a possibilidade de uma inativação

irreversível de ChrR em *C. crescentus* por hidroperóxidos orgânicos. Consistente com essa suposição, uma diminuição mais rápida dos níveis de σ^R foi observado na presença de tBOOH quando comparado com àquela notada após a interrupção do estresse por $^1\text{O}_2$. Portanto, uma inativação reversível de ChrR por hidroperóxidos orgânicos é esperada, da mesma forma que durante o estresse induzido por cádmio.

5.3.Efeito tóxico de σ^R quando presente em altos níveis em células de *C. crescentus*

Apesar da importância de σ^R para a sobrevivência de *C. crescentus* na presença de $^1\text{O}_2$, altos níveis desse fator sigma parecem ser tóxicos para células crescendo sob condições normais. Essa observação também poderia explicar a dificuldade encontrada para a deleção da cópia cromossômica de *chrR*. Como mostrado anteriormente, ChrR age como um regulador negativo da expressão de σ^R , mantendo esse fator sigma em níveis reduzidos na célula. Assim, ao inativar o gene *chrR*, a expressão de *sigR* aumenta, resultando em altos níveis da proteína codificada por este gene, o que poderia interferir com a fisiologia de *C. crescentus* de modo análogo ao observado com a superexpressão de *sigR* na linhagem parental, ou de forma ainda mais severa, inviabilizando as células. Contudo, o crescimento normal das linhagens mutantes em *chrR* obtidas no presente trabalho pode ser justificado pelo fato de que os níveis de σ^R em células dessas linhagens são inferiores (portanto, toleráveis) ao observado com a superexpressão desse fator sigma na linhagem parental, onde o efeito negativo da expressão aumentada de σ^R sobre o crescimento é evidente. Os níveis menores que os esperados desse fator sigma nos mutantes condicional e nulo em *chrR* são decorrentes da expressão de ChrR de modo independente de xilose e da ocorrência de mutações espontâneas que diminuem ou suprimem completamente a atividade de σ^R , respectivamente. ChrR codificado a partir da cópia plasmidial do gene *chrR* consiste numa proteína de fusão com uma região N-terminal de 151 resíduos de

aminoácidos codificados pelo vetor pUJ142. A presença dessa região adicional poderia prejudicar o dobramento correto da região N-terminal de ChrR, resultando numa proteína com capacidade diminuída de associação com σ^R . A observação de que ChrR de *R. sphaeroides* e, provavelmente de *C. crescentus*, interage através de sua região N-terminal com o fator sigma cognato reforça a suposição de que a proteína codificada pela cópia plasmidial de *chrR* não é totalmente funcional como sua equivalente codificada pela cópia cromossômica do gene. Os níveis de σ^R em células da linhagem SG254 também sugerem que a proteína mutante ChrR/C186-188S não é completamente inativa, justificando, portanto, a facilidade de obtenção dessa linhagem.

Esse efeito tóxico de σ^R quando presente em altos níveis em *C. crescentus* pode ser consequência da superexpressão de um ou mais genes regulados por este fator sigma. Dentre esses genes, os mais prováveis são aqueles envolvidos na degradação de constituintes celulares tais como ácidos graxos e nucleotídeos e seus derivados. Alternativamente, a expressão diminuída de genes como consequência do aumento dos níveis de σ^R poderia explicar o efeito tóxico desse fator sigma. Dentre os genes menos expressos na presença de níveis elevados de σ^R , *ftsZ* deve receber uma atenção especial por codificar a proteína estrutural do anel Z, o qual é necessário para a divisão celular. Dessa forma, a expressão reduzida desse gene poderia resultar no atraso na formação desse anel na célula e, portanto, no crescimento mais lento de culturas de *C. crescentus* superexpressando *sigR*. A diminuição da expressão de genes em células com altos níveis de σ^R pode ocorrer como consequência da competição entre essa proteína e o fator sigma principal de *C. crescentus*, denominado σ^{73} , pela quantidade limitada do cerne da enzima RNA polimerase.

Conforme mostrado pela análise da expressão de alguns genes regulados por σ^R , incluindo o próprio gene que o codifica, esse fator sigma é aparentemente mantido em *C. crescentus* em níveis reduzidos e num estado totalmente inativo durante as condições normais de crescimento, evitando, portanto, o

efeito tóxico de σ^R sobre essa bactéria. Além de *chrR* de *C. crescentus*, somente alguns poucos exemplos de efeito tóxico resultante da deleção de um fator anti-sigma foram descritos (Paget *et al.*, 2001a; Sauviac *et al.*, 2007).

5.4.Resposta mediada por σ^T ao estresse osmótico em *C. crescentus*

Os dados mostrados aqui também indicam a presença de um sistema molecular em *C. crescentus* que está envolvido na resposta dessa bactéria a condições de hiperosmolaridade. Três potenciais fatores sigma da subfamília ECF (σ^T , σ^U e σ^E) fazem parte desse sistema molecular e estão organizados hierarquicamente numa cascata de regulação, na qual σ^T aparece como responsável pelo controle dos níveis de expressão de σ^U e σ^E . Adicionalmente, σ^T é capaz de controlar positivamente a expressão do próprio gene que o codifica na presença de NaCl ou sacarose, resultando numa amplificação da resposta mediada por este fator sigma. Os dados disponíveis também sugerem que a indução da expressão de *sigU* durante o estresse osmótico não é mediada por σ^E , da mesma forma que σ^U não é capaz de regular a expressão de *sigE* durante essas condições. Portanto, σ^T parece controlar a expressão de *sigU* e *sigE* de maneira independente dos produtos desses genes.

O fato de σ^T estar localizado no topo dessa hierarquia de regulação sugere que esse fator sigma controle um amplo conjunto de genes, incluídos os regulons de σ^U e σ^E . A comparação dos perfis transcricionais de células das linhagens parental e mutante em *sigT* expostas ao estresse osmótico revelou que um total de 39 outros genes parecem ser regulados por σ^T em *C. crescentus*, muitos dos quais estão envolvidos em respostas gerais a condições de estresse, no transporte através da membrana externa, na biossíntese do envelope celular ou na manutenção de sua estrutura (Alvarez-Martinez *et al.*, 2007). Contudo, genes responsáveis pela biossíntese ou captação de solutos compatíveis através da membrana interna da célula, os quais são importantes para a manutenção da

pressão de turgor e da forma da célula (Poolman and Glaeser, 1998), não estão sob controle de σ^T . Dentre os genes dependentes de σ^T , menos da metade (incluindo *sigT* e *sigU*) é provavelmente regulado de maneira direta por esse fator sigma, já que possíveis elementos promotores reconhecidos por σ^T foram encontrados na região a montante desses genes (Alvarez-Martinez *et al.*, 2007). Essa observação permite supor que a expressão dos demais genes dependentes de σ^T é regulada indiretamente por esse fator sigma, via σ^U ou σ^E .

Embora os genes *sigU* e *sigE* tenham sua expressão dependente de σ^T , estes genes não são necessários para a viabilidade da bactéria durante condições de estresse osmótico ou oxidativo, ao contrário de *sigT*. Desse modo, esses dados sugerem que os genes regulados diretamente por σ^T consistem nos principais determinantes da viabilidade celular durante os estresses osmótico e oxidativo, e que os genes regulados por σ^U e σ^E são provavelmente necessários durante outras condições de estresse não identificadas até o momento. Alternativamente, o papel essencial de *sigT* pode ser consequência do número maior de genes que são afetados na célula em decorrência de sua ausência quando se compara com os efeitos sobre a expressão gênica causados pela inativação de *sigU* ou *sigE*.

Ao contrário do que foi observado para os demais fatores sigma analisados (σ^R , σ^T e σ^E), somente um pequeno aumento da expressão de *sigU* ocorre quando altos níveis do fator sigma codificado por este gene estão presentes nas células de *C. crescentus*. Dada a alta similaridade entre σ^T e σ^U em nível de sequência (Fig. 21B) e a presença de um promotor dependente de σ^T localizado a montante de *sigU* (Alvarez-Martinez *et al.*, 2007), é possível que esse efeito sobre a expressão deste gene seja consequência da sobreposição das especificidades de σ^T e σ^U no reconhecimento de seus elementos promotores, e não da capacidade de *sigU* de regular sua própria expressão. De qualquer modo, níveis aumentados de σ^U durante a exposição de *C. crescentus* ao estresse osmótico também poderia contribuir para a amplificação da resposta mediada por σ^T . Por outro lado, as análises de *sigE*

sugerem que esse gene pode induzir sua própria expressão (de modo independente de σ^T) nesta bactéria durante uma condição de estresse ambiental ainda não identificada.

Além de mediar a indução dos genes pertencentes ao seu regulon na presença de NaCl ou sacarose, σ^T parece regular a expressão desses genes mesmo durante as condições normais de crescimento da bactéria, conforme mostrado a partir de análises quantitativas de RT-PCR da expressão de alguns dos genes dependentes desse fator sigma (Alvarez-Martinez *et al.*, 2007). Isso sugere que a atividade de σ^T não é totalmente inibida durante o crescimento de *C. crescentus* sob condições normais, ao contrário do observado para o fator σ^R . Tal suposição também fornece uma explicação para o fato de as células mutantes em *sigT* serem mais sensíveis que as células da linhagem parental a H_2O_2 apesar de não ser observada indução da expressão dos genes *sigT*, *sigU* e *sigE* durante essa condição de estresse. Assim, os níveis basais de expressão dos genes regulados por σ^T devem ser suficientes para garantir a sobrevivência de *C. crescentus* à exposição a H_2O_2 2,5 mM.

Ao contrário do observado para o gene *sigU*, o qual parece ser transcrito unicamente a partir de um promotor dependente de σ^T , os dados de expressão de *sigT* durante condições normais de crescimento sugerem a existência de pelo menos um promotor, além daquele reconhecido por σ^T , controlando a transcrição deste gene, o qual deve ser regulado por outro fator sigma. Isso é vantajoso para a célula, uma vez que a ocorrência de mutações espontâneas nos elementos promotores necessários para a auto-regulação de *sigT*, embora possa resultar na perda da capacidade celular de induzir a expressão deste gene durante o estresse osmótico, não afeta totalmente a indução dos genes regulados por σ^T nem a capacidade das células em sobreviver ao estresse oxidativo e, possivelmente, ao choque hiperosmótico. Por outro lado, se a expressão de *sigT* fosse totalmente dependente de σ^T , as mesmas mutações secundárias resultariam na queda da expressão de *sigT* e, conseqüentemente, dos genes regulados por esse fator sigma, tornando as células mais sensíveis ao H_2O_2 , NaCl e sacarose, da mesma

forma que observado para a linhagem mutante em *sigT*. Como *sigU* não se mostrou essencial durante a exposição celular aos estresses osmótico e oxidativo, a ocorrência de mutações espontâneas nos elementos promotores dependentes de σ^T localizados a montante de *sigU* não afeta a sensibilidade celular a esses estresses, embora a expressão deste gene seja drasticamente reduzida.

Apesar da ausência de uma resposta transcricional dependente de σ^T durante a exposição de *C. crescentus* a H_2O_2 , análises previamente realizadas sugerem que esse fator sigma é inativado sob condições de estresse oxidativo induzidas por cromato ou dicromato, já que a expressão de *sigT* e de 16 outros genes regulados por σ^T aumenta nessas condições (Hu *et al.*, 2005). Interessantemente, 10 desses genes foram assumidos como sendo regulados diretamente por σ^T . As mesmas razões fornecidas no caso de σ^R podem ser usadas aqui para justificar porque os outros nove genes regulados diretamente por σ^T não foram detectados anteriormente durante o estresse por cromato ou dicromato, assim como porque alguns genes regulados indiretamente por esse fator sigma foram induzidos durante essas condições de estresse.

Apesar de preliminares, os dados referentes à caracterização do papel do gene CC3476 na resposta mediada por σ^T ao estresse osmótico sugerem que o produto desse gene está envolvido diretamente na regulação da expressão de *sigT*, atuando possivelmente como um fator anti-sigma de σ^T . Dessa forma, o gene CC3476 aparece como responsável por sentir o estado hiperosmótico em *C. crescentus* e iniciar a cascata de regulação de fatores sigma através da liberação de σ^T ativo. A capacidade de *sigE* de controlar sua própria expressão em *C. crescentus* indica a presença de um fator anti-sigma específico para σ^E . De forma análoga ao que foi observado para *sigT*, a provável organização de *sigE* numa unidade de transcrição com um pequeno gene (CC2752) localizado a sua montante pode sugerir um papel para este gene na regulação da expressão de *sigE*. Alternativamente, essa função poderia ser desempenhada pelo gene localizado a jusante de *sigE*.

Um sistema molecular semelhante ao apresentado aqui foi recentemente descrito em *S. meliloti* (Sauviac *et al.*, 2007). Nesta bactéria, não somente a resposta ao estresse osmótico, mas também ao choque térmico e à fase estacionária de crescimento parecem ser mediadas pelo fator sigma ECF, RpoE2, o qual também ocupa o topo de uma cascata de regulação, controlando a expressão de RpoE5 e RpoH II. Similarmente, a atividade de RpoE2 é regulada negativamente pelo produto da ORF smc01505 localizada a montante do gene que codifica este fator sigma. O fato de smc01505 de *S. meliloti* e CC3476 de *C. crescentus* não compartilharem similaridades significativas com fatores anti-sigma conhecidos sugere que esses genes pertencem a uma família distinta de proteínas com essa função reguladora. De fato, os genes smc01505 e CC3476 são aproximadamente três vezes menores que os demais fatores anti-sigma, são aparentemente proteínas solúveis envolvidas na percepção de sinais citoplasmáticos ao invés de sinais externos e localizam-se a montante do gene que codifica o fator sigma correspondente.

6. Conclusões

Sistema ChrR- σ^R

- Os genes *sigR*, *chrR* e CC0646 estão organizados numa provável unidade de transcrição.
- σ^R é tóxico para *C. crescentus* quando presente em altos níveis durante condições normais de crescimento da bactéria.
- σ^R é expresso nas células durante condições normais de crescimento, mas é mantido num estado totalmente inativo.
- A expressão de *sigR* aumenta durante a exposição de *C. crescentus* a cádmio, hidroperóxido orgânico e oxigênio singlete de modo dependente de σ^R .
- σ^R regula a expressão de genes relacionados com o reparo de DNA e proteínas, a modificação de ácidos graxos insaturados, o controle do pool de nucleotídeos e metionina, a detoxificação de intermediários tóxicos gerados durante o estresse oxidativo e com a síntese protéica.
- Elementos promotores identificados como sendo reconhecidos por σ^R estão presentes na região promotora de 19 genes dependentes deste fator sigma ECF.
- *sigR*, *cfaS* e CC2258 são necessários para a sobrevivência de *C. crescentus* na presença de oxigênio singlete.
- ChrR age como regulador negativo da expressão de *sigR*.
- Proteínas pertencentes à via RIP em *C. crescentus* não afetam a estabilidade de ChrR.
- Oxigênio singlete e hidroperóxido orgânico agem sobre ChrR de maneira diferente daquela usada pelo cádmio para inativar essa proteína.

Sistema CC3476- σ^T :

- Os genes *sigT* e CC3476 estão organizados numa provável unidade de transcrição.

- σ^T controla independentemente a expressão dos genes *sigU* e *sigE*, constituindo uma cascata de regulação de fatores sigma em *C. crescentus*.
- A expressão dos genes *sigT*, *sigU* e *sigE* aumenta durante a exposição de *C. crescentus* ao estresse osmótico induzido por NaCl ou sacarose de modo dependente de σ^T .
- *sigT* desempenha um papel essencial na sobrevivência de *C. crescentus* durante a exposição ao NaCl, sacarose ou H₂O₂.
- O gene CC3476 regula negativamente a expressão de *sigT*, *sigU* e, provavelmente, de *sigE*.

Diante do exposto, o presente trabalho contribuiu para a caracterização de dois sistemas da bactéria *C. crescentus* envolvidos nas respostas transcricionais aos estresses oxidativo ou osmótico. Em cada sistema, um gene foi implicado na percepção da condição de estresse e na ativação de um fator sigma ECF correspondente responsável por mediar a resposta transcricional, permitindo com que a bactéria se adapte à condição adversa de crescimento. Diferentemente da resposta a choque térmico e ao H₂O₂, os mecanismos moleculares que levam à ativação de fatores sigma nas condições de estresse observadas neste trabalho são pouco conhecidos, de modo que a elucidação dos mesmos representa uma contribuição muito valiosa para a compreensão da adaptação de *C. crescentus* a esses estresses ambientais.

7. Referências

- Abulimiti, A., Qiu, X., Chen, J., Liu, Y., and Chang, Z. (2003) Reversible methionine sulfoxidation of *Mycobacterium tuberculosis* small heat shock protein Hsp16.3 and its possible role in scavenging oxidants. *Biochem Biophys Res Commun* **305**: 87-93.
- Ades, S.E. (2004) Control of the alternative sigma factor sigmaE in *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol* **7**: 157-162.
- Ahmad, M., Jarillo, J.A., Smirnova, O., and Cashmore, A.R. (1998) Cryptochrome blue-light photoreceptors of *Arabidopsis* implicated in phototropism. *Nature* **392**: 720-723.
- Alba, B.M., Leeds, J.A., Onufryk, C., Lu, C.Z., and Gross, C.A. (2002) DegS and YaeL participate sequentially in the cleavage of RseA to activate the sigma(E)-dependent extracytoplasmic stress response. *Genes Dev* **16**: 2156-2168.
- Alvarez-Martinez, C.E., Baldini, R.L., and Gomes, S.L. (2006) A *Caulobacter crescentus* extracytoplasmic function sigma factor mediating the response to oxidative stress in stationary phase. *J Bacteriol* **188**: 1835-1846.
- Alvarez-Martinez, C.E., Lourenco, R.F., Baldini, R.L., Laub, M.T., and Gomes, S.L. (2007) The ECF sigma factor sigma(T) is involved in osmotic and oxidative stress responses in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* **66**: 1240-1255.
- Anthony, J.R., Warczak, K.L., and Donohue, T.J. (2005) A transcriptional response to singlet oxygen, a toxic byproduct of photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 6502-6507.
- Bae, J.B., Park, J.H., Hahn, M.Y., Kim, M.S., and Roe, J.H. (2004) Redox-dependent changes in RsrA, an anti-sigma factor in *Streptomyces coelicolor*: zinc release and disulfide bond formation. *J Mol Biol* **335**: 425-435.
- Baier, J., Maisch, T., Maier, M., Engel, E., Landthaler, M., and Baumler, W. (2006) Singlet oxygen generation by UVA light exposure of endogenous photosensitizers. *Biophys J* **91**: 1452-1459.
- Bertin, G., and Averbeck, D. (2006) Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* **88**: 1549-1559.
- Bessman, M.J., Frick, D.N., and O'Handley, S.F. (1996) The MutT proteins or "Nudix" hydrolases, a family of versatile, widely distributed, "housecleaning" enzymes. *J Biol Chem* **271**: 25059-25062.
- Braz, V.S., and Marques, M.V. (2005) Genes involved in cadmium resistance in *Caulobacter crescentus*. *FEMS Microbiol Lett* **251**: 289-295.
- Brun, Y.V., Marczyński, G., and Shapiro, L. (1994) The expression of asymmetry during *Caulobacter* cell differentiation. *Annu Rev Biochem* **63**: 419-450.
- Buck, M., Gallegos, M.T., Studholme, D.J., Guo, Y., and Gralla, J.D. (2000) The bacterial enhancer-dependent sigma(54) (sigma(N)) transcription factor. *J Bacteriol* **182**: 4129-4136.

- Campbell, E.A., Greenwell, R., Anthony, J.R., Wang, S., Lim, L., Das, K., Sofia, H.J., Donohue, T.J., and Darst, S.A. (2007) A conserved structural module regulates transcriptional responses to diverse stress signals in bacteria. *Mol Cell* **27**: 793-805.
- Chen, J.C., Viollier, P.H., and Shapiro, L. (2005) A membrane metalloprotease participates in the sequential degradation of a *Caulobacter* polarity determinant. *Mol Microbiol* **55**: 1085-1103.
- Cronan, J.E., Jr. (2002) Phospholipid modifications in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **5**: 202-205.
- Csonka, L.N. (1989) Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol Rev* **53**: 121-147.
- Ehrmann, M., and Clausen, T. (2004) Proteolysis as a regulatory mechanism. *Annu Rev Genet* **38**: 709-724.
- Ezraty, B., Aussel, L., and Barras, F. (2005) Methionine sulfoxide reductases in prokaryotes. *Biochim Biophys Acta* **1703**: 221-229.
- Fischer, B., Rummel, G., Aldridge, P., and Jenal, U. (2002) The FtsH protease is involved in development, stress response and heat shock control in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* **44**: 461-478.
- Fuangthong, M., Atichartpongkul, S., Mongkolsuk, S., and Helmann, J.D. (2001) OhrR is a repressor of ohrA, a key organic hydroperoxide resistance determinant in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**: 4134-4141.
- Gober, J.W., and Marques, M.V. (1995) Regulation of cellular differentiation in *Caulobacter crescentus*. *Microbiol Rev* **59**: 31-47.
- Gruber, T.M., and Gross, C.A. (2003) Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu Rev Microbiol* **57**: 441-466.
- Halliwell, B.A.G., J. M. C. (1999) *Free radicals in Biology and Medicine*: Clarendon Press.
- Helmann, J.D., and Chamberlin, M.J. (1988) Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu Rev Biochem* **57**: 839-872.
- Helmann, J.D. (2002) The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv Microb Physiol* **46**: 47-110.
- Hendrischk, A.K., Braatsch, S., Glaeser, J., and Klug, G. (2007) The phrA gene of *Rhodobacter sphaeroides* encodes a photolyase and is regulated by singlet oxygen and peroxide in a sigma(E)-dependent manner. *Microbiology* **153**: 1842-1851.
- Higgins, D.G., Thompson, J.D., and Gibson, T.J. (1996) Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods Enzymol* **266**: 383-402.
- Hottes, A.K., Meewan, M., Yang, D., Arana, N., Romero, P., McAdams, H.H., and Stephens, C. (2004) Transcriptional profiling of *Caulobacter crescentus* during growth on complex and minimal media. *J Bacteriol* **186**: 1448-1461.
- Hu, P., Brodie, E.L., Suzuki, Y., McAdams, H.H., and Andersen, G.L. (2005) Whole-genome transcriptional analysis of heavy metal stresses in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **187**: 8437-8449.

- Koide, T., Salem-Izacc, S.M., Gomes, S.L., and Vencio, R.Z. (2006) SpotWhatR: a user-friendly microarray data analysis system. *Genet Mol Res* **5**: 93-107.
- Landt, S.G., Abeliuk, E., McGrath, P.T., Lesley, J.A., McAdams, H.H., and Shapiro, L. (2008) Small non-coding RNAs in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* **68**: 600-614.
- Lee, C., Lee, S.M., Mukhopadhyay, P., Kim, S.J., Lee, S.C., Ahn, W.S., Yu, M.H., Storz, G., and Ryu, S.E. (2004) Redox regulation of OxyR requires specific disulfide bond formation involving a rapid kinetic reaction path. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 1179-1185.
- Lee, E.J., Karoonuthaisiri, N., Kim, H.S., Park, J.H., Cha, C.J., Kao, C.M., and Roe, J.H. (2005) A master regulator sigmaB governs osmotic and oxidative response as well as differentiation via a network of sigma factors in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **57**: 1252-1264.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408.
- Lonetto, M., Gribskov, M., and Gross, C.A. (1992) The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J Bacteriol* **174**: 3843-3849.
- Lonetto, M.A., Brown, K.L., Rudd, K.E., and Buttner, M.J. (1994) Analysis of the *Streptomyces coelicolor* sigE gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase sigma factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 7573-7577.
- Marshak, S., Totary, H., Cerasi, E., and Melloul, D. (1996) Purification of the beta-cell glucose-sensitive factor that transactivates the insulin gene differentially in normal and transformed islet cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 15057-15062.
- McGrath, P.T., Lee, H., Zhang, L., Iniesta, A.A., Hottes, A.K., Tan, M.H., Hillson, N.J., Hu, P., Shapiro, L., and McAdams, H.H. (2007) High-throughput identification of transcription start sites, conserved promoter motifs and predicted regulons. *Nat Biotechnol* **25**: 584-592.
- Michaels, M.L., and Miller, J.H. (1992) The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine). *J Bacteriol* **174**: 6321-6325.
- Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. New York: Cold Spring Harbor.
- Missiakas, D., and Raina, S. (1998) The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. *Mol Microbiol* **28**: 1059-1066.
- Newman, J.D., Falkowski, M.J., Schilke, B.A., Anthony, L.C., and Donohue, T.J. (1999) The *Rhodobacter sphaeroides* ECF sigma factor, sigma(E), and the target promoters cycA P3 and rpoE P1. *J Mol Biol* **294**: 307-320.
- Newman, J.D., Anthony, J.R., and Donohue, T.J. (2001) The importance of zinc-binding to the function of *Rhodobacter sphaeroides* ChrR as an anti-sigma factor. *J Mol Biol* **313**: 485-499.
- Nierman, W.C., Feldblyum, T.V., Laub, M.T., Paulsen, I.T., Nelson, K.E., Eisen, J.A., Heidelberg, J.F., Alley, M.R., Ohta, N., Maddock, J.R., Potocka, I., Nelson, W.C., Newton, A., Stephens, C., Phadke, N.D., Ely, B., DeBoy, R.T., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Gwinn, M.L., Haft, D.H., Kolonay, J.F., Smit, J.,

- Craven, M.B., Khouri, H., Shetty, J., Berry, K., Utterback, T., Tran, K., Wolf, A., Vamathevan, J., Ermolaeva, M., White, O., Salzberg, S.L., Venter, J.C., Shapiro, L., and Fraser, C.M. (2001) Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 4136-4141.
- Nystrom, T. (2004) Stationary-phase physiology. *Annu Rev Microbiol* **58**: 161-181.
- Paget, M.S., Bae, J.B., Hahn, M.Y., Li, W., Kleanthous, C., Roe, J.H., and Buttner, M.J. (2001a) Mutational analysis of RsrA, a zinc-binding anti-sigma factor with a thiol-disulphide redox switch. *Mol Microbiol* **39**: 1036-1047.
- Paget, M.S., Molle, V., Cohen, G., Aharonowitz, Y., and Buttner, M.J. (2001b) Defining the disulphide stress response in *Streptomyces coelicolor* A3(2): identification of the sigmaR regulon. *Mol Microbiol* **42**: 1007-1020.
- Pate, J.L., and Ordal, E.J. (1965) The fine structure of two unusual stalked bacteria. *J Cell Biol* **27**: 133-150.
- Poindexter, J.S. (1981) The caulobacters: ubiquitous unusual bacteria. *Microbiol Rev* **45**: 123-179.
- Poindexter, J.S., and Hagenzieker, J.G. (1981) Constriction and septation during cell division in caulobacters. *Can J Microbiol* **27**: 704-719.
- Poolman, B., and Glaasker, E. (1998) Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol Microbiol* **29**: 397-407.
- Pugmire, M.J., and Ealick, S.E. (2002) Structural analyses reveal two distinct families of nucleoside phosphorylases. *Biochem J* **361**: 1-25.
- Rava, P.S., Somma, L., and Steinman, H.M. (1999) Identification of a regulator that controls stationary-phase expression of catalase-peroxidase in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **181**: 6152-6159.
- Ravanat, J.L., Douki, T., and Cadet, J. (2001) Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J Photochem Photobiol B* **63**: 88-102.
- Ryan, K.R., and Shapiro, L. (2003) Temporal and spatial regulation in prokaryotic cell cycle progression and development. *Annu Rev Biochem* **72**: 367-394.
- Sauviac, L., Philippe, H., Phok, K., and Bruand, C. (2007) An extracytoplasmic function sigma factor acts as a general stress response regulator in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **189**: 4204-4216.
- Schnell, S., and Steinman, H.M. (1995) Function and stationary-phase induction of periplasmic copper-zinc superoxide dismutase and catalase/peroxidase in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **177**: 5924-5929.
- Schobel, S., Zellmeier, S., Schumann, W., and Wiegert, T. (2004) The *Bacillus subtilis* sigmaW anti-sigma factor RsiW is degraded by intramembrane proteolysis through YluC. *Mol Microbiol* **52**: 1091-1105.
- Song, T., Dove, S.L., Lee, K.H., and Husson, R.N. (2003) RshA, an anti-sigma factor that regulates the activity of the mycobacterial stress response sigma factor SigH. *Mol Microbiol* **50**: 949-959.
- Stohs, S.J., and Bagchi, D. (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* **18**: 321-336.

- Storz, G., and Imlay, J.A. (1999) Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol* **2**: 188-194.
- Susin, M.F., Baldini, R.L., Gueiros-Filho, F., and Gomes, S.L. (2006) GroES/GroEL and DnaK/DnaJ have distinct roles in stress responses and during cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **188**: 8044-8053.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1992) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* **24**: 145-149.
- van Helden, J. (2003) Regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res* **31**: 3593-3596.
- Vuthoori, S., Bowers, C.W., McCracken, A., Dombroski, A.J., and Hinton, D.M. (2001) Domain 1.1 of the sigma(70) subunit of Escherichia coli RNA polymerase modulates the formation of stable polymerase/promoter complexes. *J Mol Biol* **309**: 561-572.
- Wondrak, G.T., Jacobson, M.K., and Jacobson, E.L. (2006) Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. *Photochem Photobiol Sci* **5**: 215-237.
- Wosten, M.M. (1998) Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol Rev* **22**: 127-150.
- Yang, Y.H., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D.M., Peng, V., Ngai, J., and Speed, T.P. (2002) Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* **30**: e15.
- Zellmeier, S., Schumann, W., and Wiegert, T. (2006) Involvement of Clp protease activity in modulating the *Bacillus subtilis* stress response. *Mol Microbiol* **61**: 1569-1582.
- Zuleta, L.F., Italiani, V.C., and Marques, M.V. (2003) Isolation and characterization of NaCl-sensitive mutants of *Caulobacter crescentus*. *Appl Environ Microbiol* **69**: 3029-3035.

Apêndice.

Alinhamento das seqüências de aminoácidos das proteínas ChrR encontradas em diversas espécies de bactérias. O gene codificando cada uma das proteínas ChrR mapeia-se a jusante de um gene homólogo de *sigR* de *C. crescentus*. A seqüência de aminoácidos deduzida a partir de *chrR* de *C. crescentus* (Ccr; NP_419464) foi alinhada com a seqüência do fator anti-sigma ChrR de *R. sphaeroides* (Rsp; YP_354180) e com as seqüências das proteínas putativas ChrR de *Mesorhizobium loti* (Mlo; NP_108267), *Azorhizobium caulinodans* (Aca; YP_001527026), *Acidovorax avenae subsp. citrulli* (Aav; YP_971894), *Magnetospirillum magnetotacticum* (Mma; ZP_00056407), *Parvibaculum lavamentivorans* (Pla; YP_001413140), *Rhodospirillum rubrum* (Rru; YP_425812), *Rhodobacterales bacterium* (Rba; ZP_01743422), *Silicibacter pomeroyi* (Spo; YP_166720), *Sagittula stellata* (Sst; ZP_01748778), *Rhizobium leguminosarum bv. viciae* (Rle; YP_765087), *Dinoroseobacter shibae* (Dsh; YP_001531715), *Rhodopseudomonas palustris* (Rpa; YP_779730), *Xanthobacter autotrophicus* (Xau; YP_001416533), *Hahella chejuensis* (Hch; YP_437682), *Oceanicola granulosus* (Ogr; ZP_01154737), *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola* (Psp; YP_273201), *Oceanicola batsensis* (Oba; ZP_00999623), *Roseobacter denitrificans* (Rde; YP_681073), *Pseudomonas syringae pv. syringae* (Pss; YP_233987), *Roseobacter litoralis* (Rli; ZP_02143460), *Pseudomonas syringae pv. tomato* (Pst; NP_790878), *Marinobacter aquaeolei* (Maq; YP_957805), *Saccharophagus degradans* (Sde; YP_527944), *Marinobacter algicola* (Mal; ZP_01894716), *Loktanella vestfoldensis* (Lve; ZP_01002436), *Vibrio fischeri* (Vfi; YP_206723), *Vibrio parahaemolyticus* (Vpa; NP_798736), *Vibrio shilonii* (Vsh; ZP_01870207), *Maricaulis maris* (Mmr; YP_755506), *Hyphomonas neptunium* (Hne; YP_762000), *Idiomarina loihiensis* (Ilo; YP_155781), *Idiomarina baltica* (Iba; ZP_01042686), *Pseudoalteromonas tunicate* (Ptu; ZP_01132020), *Oceanicaulis alexandrii* (Oal; ZP_00958044), *Shewanella baltica* (Sba; YP_001050960), *Shewanella amazonensis* (Sam; YP_927912) and *Vibrio cholerae* (Vch; NP_231932) usando Clustal W (Higgins *et al.*, 1996). As posições correspondentes aos aminoácidos idênticos e conservados são mostradas através de asteriscos e ponto, respectivamente. Os resíduos conservados de cisteína estão em cinza e os motivos de ligação ao zinco aparecem sublinhados.

Ccr -----MSLRRLPSEERLLAYAAGTSL-PPEAVVVATHLALRPETRVWSDLGQAVGGVLEDLPSALDAGA-LDKTLALLD-----QPEPQEPT 82
 Mlo -----MIKHHPSDETLFRYANGSLE-SGPRIVVAVHVGACTAQAERIAAGFEALGGSLLHDI EPEDMEPGA-LDHVMAMIDT--GEASR-----AKAAP-ANR 87
 Aca -----MTTPHDETLASYAAGTLD-AGIRLAVAHALEAPKSRARLAHFEAAAGAVLDDLPPTDLASDA-LDRLLARLDEPEPPP-----PAPIP-VRH 85
 Aav -----MTIHHHPGDDLLDLAAGRLP-PGPALLASVHAEMCPQCGQRLRALAEAGGVLLSLPPETLRPDA-LSRVLGALDALPGDDARR-----PGAAAEF-VAG 93
 Mma -----MSATCHPSDELLVAYGAGSLD-EAASLLVATHLALCPKRAAEVGR IEAMGGAVIETLPPSDLGADA-LASVLRALDQLPGAMP--SPVVA 88
 Rsp -----MT-IRHHVSDALLTAYAAGTSL-EAFSLVVATHLSLDCDECRARAGALDAMVGGSLMEETAPValsegs-LASVMAQLDRQI-----QRPAPARRA 86
 Pla MSAHFLHHPVRHPLGEWLMAYAAGALS-EGQSLLVASHLSYLDLDTASRLAVAEAAAGGALLEAVDPAARMAPALANTLARLDETQRQE--TKA-----APRAKDQTNVDV- 100
 Rru -----MTLSHHPSESLLAAYAAGVLG-EGASLIVAAHLTLCPHCRGAVDHLEALGGALLEEMAPLALAEAGA-LDAVLARLDT-PAAPSPTR-----ATASRLPPPMGE 95
 Rba -----MYVNMTDITHHTPDALLAAYAAGTLP-QPFALVVAHLSLCLKRAAEFAHQAI GGIVLEGFDAVEISPD-LKTNVLSLLDAPD-----QESDVYAR 90
 Spo -----MSAINHHVPDAMLAAYAAGTLP-YAFAVAVASHVSLCAQCRVALEAHQAVGGAVLETAADAVAVSSSL-KDSILARLDDPF-----TPEPVYER 86
 Sst -----MTEINHHLTESLVMGYAAGTLP-EAVNLIVAAHVSMCDTCRAAVEAHEALGGALLDDTDAMVMDGA-LQALDAVRGAD-----PEPRPIRVAEP 89
 Rle -----MIEHHLDDMLLHYSAGTLA-EGWSVAVATHLALCPLCRTNLAMLENVGGYFLESQDAGKDDVTASWQSLRARI EAGEIEK-----VVPICKHTAA 90
 Dsh -----MTGIKHHLNDALLMAYSAGTLP-EAFSLVVATHISMCDTCRAALAAHDAVGGALLEDTAEVELAPEA-LDKCLAAIQALPKGPIKL-----PKSMTNGSA-PR 96
 Rpa -----MSVQPHISDDL LLSYAAGTLD-EASGLLVATHLALCPHCRARNAAADAVGGHLLALPAELSPGL-MDAVLSRARGQAP-----AAPTLPVPRPS 90
 Xau -----MSVHSHPGDATLLRYAAGTLP-AGPALLVEIHLQCGPHCRAAVRRFEAVGGALLDAAEPALAAADA-FARTLARLG-PAPVSGGLTGGA--RRDHLEAASFSGPAAAPRLPE 107
 Hch -----MSQHHPSDDILMEYAAGCAS-PHALCVAVHLQYCPHCRAGIQRNLALGGEMLQQLPQEDLNEAL-FERIMLRILEES-----APATLQKP 85
 Ogr ---MPDPARINHHLTESLLLAYATGELP-EAFSIAVAHLSLDCDECRARSMTFDVLGGALLETHAEV-LSDGA-LAATLARVRSEGP-----APTPTPVP 90
 Psp MSPR-----HHPDDATLVSYAAGALS-QVLAVVTAHLERCACRRLRQAEI GGVLMMQHTSSVVPLKGRSAMLARLDERQTG--AEP-----AMYSTPAANQDP 94
 Oba -----MSIKHHLTESLLMGYAAGTLP-EAFNLVVASHVSMCDSCRAAVESYETLGGALLDDTSSEMADGL-ASCLARLDGGGD-----EVIVPPRPAAP 88
 Rde -----MTDTIKHHLNDAILMAYSAGTLP-EAFNLVAAHLSLDCSCRAQAESFDALGGALLEQSADTEMNNS-FANTMDLIAGGDI-----DVTMPAAKTTP 91
 Pss MGPQ-----HHPDDATLVSYAAGALS-QVISLVTAHLERCACRRLRQAEI GGVLMMQHTSSVVPLKGRSAMLARLDEQQAG--LVP-----AMHSMPAANQDP 94
 Rli -----MTDTIKHHLNDAVLMAYSAGTLP-EAFNLIVAAHLSLDCSCRAQAESFDALGGALLEQNADTMDNNS-FANTMDLIAGGDI-----AVTVPAEMTP 91
 Pst MGPL-----HHPDDATLISYAAGALS-QVIAVVTAHLERCACRRLRQAEI GGVLMMQHSISRVVPLKSRMAMLARLDEQETS--VDS-----VMHAMPAANHDP 94
 Maq -----MTRHHPDSLMEYSAGNLS-EPHALCIRLHLEQCPHCRSRVDTLNSLGAVMMDHQPKVTADSS-FEQLMARIDSSPQ-----ASSPVVP 84
 Sde -----MANFHPSDNTLIEYSAGNLP-AALAICVAHLEYCPQCASHRASQLNSLGGTLLETSAKAQVASTS-FTQLMARIQAAPT-----MGDIKAPV 85
 Mal -----MTRHHPDTLTLMEFSAGNLS-EPHALCIRLHLDQCPHCRSRVDTLDSLAVMMESQPQGVSSDM-FDAILSRIDSEPD-----MTETYIST 85
 Lve -----MKKIKHHLTDALLVGYAAGNLP-EAFNLVVATHISMCDTCRAALAEFDVAVGGEVMDADPVDMAEDA-LAAAMARIMDAP-----CMERVSAPKA 88
 Vfi -----MNKITYHPKDELLSSHANGDLP-ESLAVASLHCELCPCQCKKLDAITNRLASKTWDSTGSKEEKDANEKAIDSDFDSMLAN-----IMALEIEPHTLAPEP 97
 Vpa -----MNKHPDNNLLEAYASGSID-AVSGLVVATHLETCSKCRAYVN--QVEASQANTVSESPSEYSP----EFDDMLNDIINA-----EPVNDNVVIQD 83
 Vsh -----MSHHPNSELLKLYATGEID-SAHGAAIASHIESCSECRAKVMRFETEEAGAMMSLSKDEKSSKDLVLVFSNMLDDIMTL-----DADYSKPKVRK 90
 Mmr MTQR-----GHTLDDAWYLGYAAGSLASEAETVLVQSHVELNSDAQDRVEQLDRIGGVLLDRMPVGEALPFS-ADELLEMADRS DP--LQA-----GESVSDEAANVP 95
 Hne -----MTSDSPNSFSELYSAYAAGCID-PAFALMLEAQSLMRSDVRRSVAMSEMISGSFLDSAPAARMRDGA-LERTLAKIDAIEARP-----EQQRAAGKAAG 92
 Ilo -----MMIKSHPGEGLLYQYASGDLS-AAMTLVVGTHIDMCKACRQTVCEIEQKLCEENLDTLVSFAST---TMSKSQCDQMLEA-----IFASSACNKQAHQP 90
 Iba -----MIKSHPSEAILLYQYASGDLS-ASMTLVVGTHIDMCPICKRTVCEIEEDLCSKHLDSLVTICAPSKGAMSKTQCDQMLEA-----IFNSQA--KPAAQR 91
 PtU -----MIKFHPKLELLQSYVLGELP-ASLTAAISMHADFCQCEAKQITQLTCESADTFDSPLADFSTKAIDINDAELSAMMHA-----ICDNDIYEAPVQS 92
 Oal -----MTNHPLG--DEIYTAYASGALS-APMRLLLDAQA AVNADVAQARDVVETMAGILLEQETPASMPMDA-LATLFDVIDSEEAGLGEAGP-----ARFDSRAGSERSRNAASKAG 104
 Sba -----MIKHHPPQELLVSHANGVLP-LSMAIAVSAHCALCETCREQLALLTEQAANSALNPDGAHAHAQKHIGQELIHTAHIDAGNTQATN-----VPVMDIDDMLAQIMAQP 103
 Sam -----MIKHHPSDEMLLTHAAGETV-LGLAIALSAHCELCPTCAAKVEHFQHKLAMHHLPLPDQTS EAPSGVISKSASEGHIDQSGVSALDSAWDISWESQDNSLDSLFDATATP 111
 Vch -----MSYHPNYALLAAYAEGGLD-SAHGLAISAHLEICPHCRDLVHEIEAELGELLNQQAASSVALSDD--ANWQAMFDSIVALP-----QQAASNTPVKTT 90

*

Ccr VR-----LDKTDPTLPAPLRGFGELGPWRWLGPVVRVVDVLGP-RDGDRCVILLKFIAPGQSTPLHHTGGVELTCVIEGAYATESGVFEEGDFEEDADPSVLHQPRVV 181
 Mlo LP-----RADVGIRLPEVLDDCGIGPWRWIGPGVVRWSRVTLTLP-DDDSANVMLLKVVAGRKLPETHAGYEYTHILKGAFSDARGRYGPGDLDEADDVQHQPIVD 186
 Aca AA-----RMPTDVRLPKALEGCSIGRWIWIWPGVRYSAISIP-GAPKANVGLVEVGPGRMPDHGGGNEITYVISGGFSDENGHYEAGDVCEADESLEHQPVAD 184
 Aav GP-----DWPAGTPWPQALRGVAFSPWKWIAPGMRWSRPLSP-PAGDVNVFLLRIGPGRSLPAHTHGGLEWTQVLHGAFHDGHALFGAGDFDAADGNVHHQPVVQ 192
 Mma AP-----GLSPRLDYLP-ASLEALPWKRLAGIEQAILLQ--ARGIRARLLRIGAGIVVPEHGHGGMELTMVLQGGFTDSGTGYARGDVAMADQVVHSPAAD 184
 Rsp DP-----RAPAPLADYVG-RRLEDVWRRTLGGGVQ--AILPT-GG-EAIAARLLWIPGQAVPDHGHGRLETLVLQGAFRDETDRFGAGDIEIADQLEHTPVAE 182
 Pla -----LPPPLRAWLG-RGVDELNWSLLGPGMKVKLWRG-GPNQQLRWMLRARPGIEIPMHGHSGETELVLVLKGSLEDEHGIFRAGDVESNDDRIHSLRTG 195
 Rru AA-----LLPAPLRRHLADPSAATLPWRAIAPGIRQIALLPR-TAGGGNAHLKFIAPKTALPRHGHGGQEYTLVLGAGAFQDRSERFARGDVAEVEDRVHQPITD 194
 Rba TG-----VYPGPVMQALK-G--KPPRWRRLLGGGVQ--NILSA-DE-SGSVRLLYIPPGQAVPDHHTGGLETLVLQGSFSDETGRFDVGDLEVAEDDLHTPIAD 184
 Spo SG-----IYPGPVIEAMQ-R--RAPKWKKLGMGVQ--DILSA-DA-HGSVRLLYIPPGQAVPDHSHNGLEMTLVLQGSFSDATGHFVGVDIEIADETLEHTPVA 180
 Sst DP-----IVPAPLADYIG-GGLDDVWRWRPLGMGVQ--AILPT-AP-GATARLLFIPAGTAVPDHGHNGLETLVLQGAFSDEGGRYARGDVEVADGDTEHMPVAD 185
 Rle NN-----TYPEPLRSYIE-Q-AGGLKWRRLGRGAAQ-MIIPPT-DDNTTTVRLLLKFIAPGQVPPEHSHGSELTVLVDGSFSDDEVSTFARGDVEMADGLMHQPRAS 186
 Dsh SS-----VFPSPLAEYVK-GDVEDVNWRSVGLGVQ--AILPT-SK-EASVRLLYIPAGAEPVDHGHGGTELTVLQGAFRDEFDRFGPGDIEVADPNVEHTPVAE 192
 Rpa EI-----VIPEPLRGYLG-GDLDSLWRTLAPRVQ--VAIDI-PGSRPQARMLRFQCGTQVPAHGHGGRELTVLVSGSLCDRDAVLYRGDVAETDEHTEHQPHAG 187
 Xau GL-----VLPEGVRLPRPLTSRRIGAMMPVAPGVVRVGRVHVP-EDGQSNVFLFQIGPGRAIPRHTHDGTEYTHVICGGFSDPSGHYGAGDLVEADGDVEHSPRVD 206
 Hch VED-----LLQRWLPEGLS-----AVSWRKQWFKVYEVVLEVSRLKGR-QRLSLQKIAAGGRAPLHAHYGQEVTVVLQGGFSDDELGVYEEGDFVIRSGQRRHRPRAL 180
 Ogr AD-----VLPAPVGRYVG-GGLDAVRWRPLGGGVQ--AILYR-DE-HATARLLSIAAGAAVPDGHGAGTEITVLGAGAFSDGIGRFGPGDVELADEVDHQPVAD 186
 Psp D-----LLPVCMAHFG-RQLSTLWKTLVPGVQR--VRAQ-GIEQGNLMLLKFIAPGVSMFVHSHESGEMTMVLKGAYHDIQGAFALNDVADLDSHIHQPIAY 189
 Oba G-----TLPAPLRDYVG-GDLEAIRWRPVGGGVQ--AILPT-SA-SASARLLFIPAGAAVPDHGHGRMELTMVLQGAFADETDRFGRGDVEVADEEHEHMPVAE 183
 Rde G-----VLPKPIQDYVG-GDLDSIKWKPIGMGVQ--AILPT-SK-DATARLLLIPAGTAMPDGHGKGTEMTMVLKGAFQDDGDFYARGDVEIADSDLHHTPVA 186
 Pss D-----LMPVCMQAHFG-RHLSTLWKKTLPVGVK--VRAE-GIEQGNLMLLKFIAPGVSMFVHSHESGEMTMVLKGAYYDVQGEFGLNDVADLDSHIHQPIAY 189
 Rli G-----VLPKPIQDYVG-GDLDSIKWKPIGMGVQ--AILPT-SK-DATARLLLIPAGTAMPDGHGKGTEMTMVLKGAFQDDGDFYARGDVEIADSDLHHTPVA 186
 Pst D-----LLPHCMHAHFG-RHLSTLWKKTLPVGVQR--VSAQ-GIEQGNLMLLKFIAPGVSMFVHSHESGEMTMVLKGAYHDVQGEFGLNDVADLDSHIHQPIAY 189
 Maq QPK-----VSPLQKLLGDDIN-----ALPWKRQLADVSLDITDKFPGQNERVVLQKLAVGGKAPATHRGDETTIVLQGAFAQDKGVFNQWDFVVLNEQDEHRPVAV 182
 Sde ATAT-----KTSAPKNLPKVINKLIHAPRLKWRVSPALKEAIVTVGQDQYEVCFHRIKGGKVAEHDHGGTEITVVLEGSFSDDELGTYYTVGDYIEKQPGDIHRPMAT 189
 Mal QAKR-----MSPLQKLLGDDLN-----ALPWKRQLGDVSLDISERFPGQNEQVVLQKLAAAGKAPATHRGSETTIVLQGAFSQKGVFNQWDFVVLNEQDEHKEPVAV 184
 Lve GG-----VFPAPLRGYVN-GDLDRVKWRKIGGGVQS--MVLKT-EG-GASVRLLRIPAGTAVPDHGHGRTELTVLQGAFAVDATDRFAAGDIEVANEDLNHTPVAE 184
 Vfi VY-----TLFIDDKKEYQLPYILHRYDNLK-----WNHLGAVSRTRLNE-EQDTRSLLHLIKPGGEIPHHTHKGFEFTLLLDGSFDESGHYQKGDFIWLDAASNHSHPKTS 196
 Vpa TA-----FVNAGKSFELPKTLVRFSDLVG--SWRSYGGKVFSQAIDLGEDAR-VSLMYIGENVQIPQHTHRLGSESTLVLHGGFSDDEDGQYEEGDLMVRDASVKHSPFTQ 185
 Vsh PG-----KVQVDGKEFTVPATIAPLVERMS--EWRSYGGKVFTSTIDVDEECR-VSLLYINQGVQVQPHTHKGFEFTLVLHGSFKDEKGEYHVGDFIREDETGHKAPQTV 192
 Mmr DALD-----GVNLPPALAQYLA-RSPARLKWFEFLGPLRKSILWRG--KDGERLWLLKAQPGVAIPHHGHAGSELTVLVLKGSFWDGDQYERRGDVEEAHEDVEHDIRIG 196
 Hne GAIN-----EILELEPEPVRGAAINAVGKQGWQIVSLGLKR--LKLD-VGSAMEVELYRINAGSKI PRHSHGGTEFTMVLSSGGFSDERGSYGP GDVVCVKGPSDIHQPVAD 193
 Ilo NE-----MLSLEGRRTFLPRTLAHNSHRIG--EWSKLVGKLWRAPLTLDNNGQ--TNLIYMAPGAKLPEHTHKGKEATLVIDGVFNDEQSEYRDGDFILLDPSRTHTPETQ 192
 Iba ED-----LVSLEGRFRNLPTTLAHNAHRIG--EWTHLVGKLWRAPVLDSDDGQ--TNLIYMEPGAQVPEHTHKGQEATLVIDGVFNDEHDAYYDGDFILLDADRKHPTPTA 193
 Pt PE-----IELKGNVYSVPRLRSLNMSG----WYKMGKLSRARIDFNEGALHSSLLHIDQGGSVPMHTHKGFEFTLLLDGSFSDDMGHYEKGDFILLDGKHTHNPMTE 191
 Oal QAID-----ELLNLDPVRLDALD---QGGWSFAGPGVRN--MTLL-NEDGAKAELIRIEPGRGVPHHGHDCTEFTLVLTGGFSDGRASYGPGEVCMANPDITHKPVAD 202
 Sba AA-----TDVPNNAPLDVQVKQQHYTVSPVFRQHLARP----WQILGKVSRRMFRDVEDEMNTRASLLHIDAQGEIPQHTHKGYELTLLLAGAFSDLNGDYVPGDIVLDSQHHHSPKTV 212
 Sam AANAAQISATAGNAVLLATEVKGVSYPKAFRPFIANPALASSWSGIGQVSRMLRDLTRDGKARSSLLHIAAGGEIPEHTHKGQEITLLHGHFSDMGDYAPGDFMVTDRHQHTPKTL 231
 Vch PV-----MVTVNGKQIAIPKVLARLVKPEQ--QWRSYGGKVFSPLQSEDNVR-MNLMIYISQGVSIQHTHKGFEFTLVLHGGFSDENGHYDVGDFMQHDGQICHSPSTP 192

. * * * . . *
 . *

Ccr	SSKPCLVAALDGQIQLPGRMGKLLAPFVKL-----	212
Mlo	KEGECICIAALEGQMKLSGFFGRLIQPLFGG-----	217
Aca	PEG-CLCIIAMDAPMRFKGLLGAVLKPF TG-----	213
Aav	GP GD C I C L A A V D G R L R F D G M L A R L A G S L V G M-----	223
Mma	GGETCICLAVTHGPKLTGLVGRLVNPF LDL-----	215
Rsp	RGLDCICLAATDAPLRFNSFLPKLVQPFFRI-----	213
Pla	PEEEICLAVTEGPTRFQGWLARALQPLIGL-----	226
Rru	G-QDCICLVVTEGPLRYMGMI PRLMQPFTGF-----	224
Rba	YGAPCICLAATDAPLKFNSVLPRLVQPLFRI-----	215
Spo	QGDACICLAATDARLRFNALMPRLQPLFRI-----	211
Sst	ISAD C I C L A V T D A P L K F H G V L P R L L Q P L F R I-----	216
Rle	AGKDCICLAVTDAPLRFKSRFVRWLQPLLGI-----	217
Dsh	AGEACICLAATDAPLKFRSILPKIAQPFLRI-----	223
Rpa	PDQDCICLAVTDAPLRFKGVLARLLQPLFGI-----	218
Xau	DDGT C I C L A A F E G R L R F R G L L G V V L R P F L-----	235
Hch	ENEDCICLAYLDAPVCLAGPIGRWIERFRRLFMPDLNAPAS	221
Ogr	PGGDCICLAATDARLRFHSFVPRLAGQIFGI-----	217
Psp	PDRECICVLATESRLRFHGLLARMMPFFGI-----	220
Oba	PGEDCICLAATDAPLRFRSWLPRLAQPFLKI-----	214
Rde	IHEDCICLAVADAPLEFDRLLPKIAQRFLRI-----	217
Pss	PDRECICVLATESKLRFQGLLARMMPFFGI-----	220
Rli	IHEDCICLAVADAPLEFNRLLPKIAQRFLRI-----	217
Pst	PDRECICVLAESKLRFHGWMARMMPFFGI-----	220
Maq	GCEDCITLSVLSAPLKLGTGTFRLLNPFLR-----	212
Sde	QNEDCICLSVSEAPVKITGLLGKLINPFIS-FAPR-----	223
Mal	GCEDCITLSVLSAPVKLTGTFRLLNPFI R-----	214
Lve	QGVDCICLAATDAPLQFKGLLPRLAQRFIGI-----	215
Vfi	EG--CLCYTVQNAPLYFKQGLSKLFNPIGNLLY-----	227
Vpa	EGEDCICLTVLTEPMIFTQGVARIFNLFGKGLYP-----	219
Vsh	EGQDCICLSILTEPMIFTQGVARVFNMF GKGMYP-----	226
Mmr	TGGECVCLALTQGKLRFESPLLTAQVFTGL-----	227
Hne	DDEV CYA L A V R D G G L R F T G M L G M V Q R L L G G H-----	224
Ilo	DED-CLTLATLDAPLHFTSGISRLLNPFSQLFFR-----	225
Iba	TED-CLTLATLDAPLFFTSGISRLLNPFS SLFFR-----	226
Ptu	TG--CLCFTVADDALHFTQGLSKLLNPLGSFIY-----	222
Oal	EGEVCIVLAVTDGPLAFTGALGWIQRALSR-----	232
Sba	DG--CLCYTVLDAPLHFTKGLSKLLNPIGELIY-----	243
Sam	DG--CLCYTVVDAPLHFTKGLSKLLNPIGELIY-----	262
Vch	QDQDCICLTVLTEPMVFTQGVARIFNLFGKGLYP-----	226

*

.

.

Súmula Curricular

Dados pessoais

Nome: Rogério Ferreira Lourenço

Local e data de nascimento: Itapeva, 25 de Fevereiro de 1982

Educação

EE Leôncio Pimentel- Itaberá, 1999

Universidade de São Paulo- São Paulo, 2003

Bacharelado em Ciências Biológicas

Ocupação

Bolsista de Doutorado Direto

1- CNPq- 01/03/2004 a 31/10/2004

2- FAPESP- 01/11/2004 a 31/08/2008

Publicações

- 1- ALVAREZ-MARTINEZ, C.E.; LOURENÇO, R. F.; BALDINI, R. L.; LAUB, M. T.; GOMES, S. L. - The ECF sigma factor σ^T is involved in osmotic and oxidative stress response in *Caulobacter crescentus*. Molecular Microbiology 66, 1240-1255, 2007.
- 2- LOURENÇO, R. F & GOMES, S. L. - The σ^R -mediated transcriptional response to cadmium, organic hydroperoxide and singlet oxygen in *Caulobacter crescentus*. Manuscrito em preparação.